

**Aus der Klinik für Neurologie  
in Kooperation mit dem Institut für Versuchstierkunde**

---

Akute Effekte einer pränatalen  
Betamethasonbehandlung auf die fetale  
Hirndurchblutung beim Schaf unter normoxischen  
und asphyktischen Bedingungen

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Bettina Reinhardt  
geboren am 29.05.1982 in Erfurt

### **Gutachter**

1. PD Dr. med. R. Bauer, Institut für Pathophysiologie, FSU Jena
2. PD Dr. Dr. Y. Garnier, Universitätsfrauenklinik Köln
3. PD Dr. med. M. Schwab, Klinik für Neurologie, FSU Jena

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 16.01.2007**

**Abkürzungsverzeichnis**

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
AEP	Akustisch evozierte Potenziale
ATP	Adenosintriphosphat
CBF	Cerebral Blood Flow
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
CTG	Kardiotokographie
BMI	Body Mass Index
ECoG	Elektrokortikogramm
EKG	Elektrokardiogramm
EMG	Elektromyogramm
ET	Endothelin
FMS	Fluoreszierende Mikrosphären
GR	Glukokortikoidrezeptor
HHN-Achse	Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren-Achse
11 $\beta$ -HSD	11 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase
i.m.	Intramuskulär
i.v.	Intravenös
L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin-methylester
L-NNA	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Nitritoxidsynthetase
eNOS	Endotheliale Nitritoxidsynthetase
iNOS	Induzierbare Nitritoxidsynthetase
nNOS	Neuronale Nitritoxidsynthetase
MAP	Mikrotubulus assoziierte Proteine
MDR	Multi Drug Resistance
MR	Mineralokortikoidrezeptor
MW	Mittelwert
NAD <sup>+</sup> /NADP <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid/ -Phosphat
NIH	National Institutes of Health
NREM	Non Rapid Eye Movement

PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Prostaglandine
PGE-2	Prostaglandin E2
PGF	Prostaglandin F
PLA	Phospholipase A
RAS	Renin-Angiotensin-System
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
RDS	Respiratory Distress Syndrome
REM	Rapid Eye Movement
SEM	Standard Error Of Mean
SSW	Schwangerschaftswoche
UCO	Umbilical Cord Occlusion

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
2.1. Fakten zur Frühgeburtlichkeit	3
2.2. Die klinische Bedeutung einer pränatalen Glukokortikoidtherapie	4
2.3. Die Funktion der fetalen Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse	5
2.3.1. Die Veränderungen des fetalen Kortisolspiegels während der Schwangerschaft	5
2.3.2. Glukokortikoidrezeptoren	7
2.4. Nichtpulmonale Glukokortikoideffekte	7
2.4.1. Pränatale Glukokortikoideffekte auf das kardiovaskuläre System	8
2.4.2. Pränatale Glukokortikoideffekte auf das zerebrovaskuläre System	9
2.4.3. Pränatale Glukokortikoideffekte auf das Gehirn	10
2.4.3.1. Glukokortikoideffekte auf die fetalen Verhaltenstadien	11
2.4.3.2. Glukokortikoideffekte auf die fetale Hirnstruktur	13
2.5. Die Bedeutung einer intrauterinen Asphyxie für den von Frühgeburt bedrohten Fetus	13
2.5.1. Effekte einer perinatalen Asphyxie auf das Gehirn	14
2.5.2. Glukokortikoideffekte auf das fetale Gehirn während und nach einer perinatalen Asphyxie	16
<b>3. ZIELE DER ARBEIT</b>	<b>18</b>
<b>4. MATERIAL UND METHODE</b>	<b>20</b>
4.1. Experimentelles Protokoll	20
4.1.1. Allgemeine Vorbemerkungen	20
4.1.2. Chirurgische Instrumentierung der Feten	20
4.1.3. Gruppeneinteilung	23
4.1.4. Versuchsablauf	26

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	IV
<b>4.2. Datenerfassung und Messung der Zielparameter</b>	<b>30</b>
4.2.1. Erfassung elektrophysiologischer Parameter	30
4.2.2. Blutgasbestimmung	30
4.2.3. Hirndurchblutungsmessung	31
4.2.4. Analyse des Elektrokortikogramms	34
4.2.5. Statistische Auswertung	34
<b>5. ERGEBNISSE</b>	<b>35</b>
<b>5.1. Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die fetale Hirndurchblutung bei unterschiedlichen Gestationsaltern</b>	<b>35</b>
5.1.1. Die fetale Hirndurchblutung bei unterschiedlichen Gestationsaltern	35
5.1.1.1. Physiologische Variablen und Wachstum	35
5.1.1.2. Vergleich der fetalen Hirndurchblutung zum Zeitpunkt 0,73 und 0,85 der Gestation	37
5.1.2. Glukokortikoideffekte auf die fetale Hirndurchblutung zum Zeitpunkt 0,73 der Gestation	38
5.1.2.1. Physiologische Variablen	38
5.1.2.2. Glukokortikoideffekte zum Zeitpunkt 0,73 der Gestation	39
5.1.3. Glukokortikoideffekte auf die fetale Hirndurchblutung zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation	41
5.1.3.1. Physiologische Variablen	41
5.1.3.2. Glukokortikoideffekte zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation	42
<b>5.2. Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die fetale Hirndurchblutung in Abhängigkeit von den Schlafstadien</b>	<b>44</b>
5.2.1. Physiologische Variablen	44
5.2.2. Abhängigkeit der fetalen Hirndurchblutung von den Schlafstadien	45
5.2.3. Glukokortikoideffekte auf die schlafstadienabhängigen Schwankungen der fetalen Hirndurchblutung	46
<b>5.3. Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die fetale Hirndurchblutung unter asphyktischen Bedingungen</b>	<b>49</b>
5.3.1. Physiologische Variablen	49
5.3.2. Glukokortikoideffekte auf die fetale Hirndurchblutung vor der Asphyxie	52
5.3.3. Veränderungen der fetalen Hirndurchblutung nach einer Asphyxie	53

5.3.4. Veränderungen der fetalen Hirndurchblutung nach einer Asphyxie unter Glukokortikoideinfluss	53
<b>6. DISKUSSION</b>	<b>57</b>
<b>6.1. Methodische Betrachtungen</b>	<b>57</b>
6.1.1. Der chronisch instrumentierte Schaffetus	57
6.1.2. Das Asphyxiemodell	57
6.1.3. Verwendete Glukokortikoide und Applikationsform	59
6.1.4. Pharmakokinetische Unterschiede zwischen intramuskulärer maternaler und intravenöser fetaler Applikation	60
6.1.5. Mögliche Plazentapassagebehinderung von synthetischen Glukokortikoiden durch Effluxtransporter	61
6.1.6. Plazentare Tier-Mensch-Unterschiede	63
6.1.7. Die Mikrosphärenmethode	63
<b>6.2. Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>65</b>
6.2.1. Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die fetale Hirndurchblutung bei unterschiedlichen Gestationsaltern	65
6.2.2. Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die fetale Hirndurchblutung in Abhängigkeit von den Schlafstadien	66
6.2.3. Ursachen der fetalen Hirndurchblutungssenkung	68
6.2.4. Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die fetale Hirndurchblutung unter asphyktischen Bedingungen	70
6.2.4.1. Effekte einer Asphyxie auf die fetale Hirndurchblutung	70
6.2.4.2. Glukokortikoideffekte auf die fetale Hirndurchblutung nach einer Asphyxie	72
6.2.4.3. Glukokortikoideffekte auf den zerebralen Stoffwechsel unter asphyktischen Bedingungen	73
6.2.4.4. Mechanismen der Glukokortikoideffekte auf Modulatoren des zerebrovaskulären Tonus unter asphyktischen Bedingungen	75
<b>7. SCHLUSSFOLGERUNGEN</b>	<b>78</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>80</b>
<b>9. ANHANG</b>	<b>97</b>

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>9.1. Danksagung</b>	<b>97</b>
<b>9.2. Curriculum vitae</b>	<b>98</b>
<b>9.3. Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>99</b>



## **1. Zusammenfassung**

Mittel der Wahl zur Lungenreifungsinduktion bei drohender Frühgeburt zwischen der 24. und 34. Schwangerschaftswoche (SSW) ist eine pränatale Glukokortikoidbehandlung. Zahlreiche Studien konnten nicht nur eine Verbesserung des Atemnotsyndroms und der neonatalen Mortalität, sondern auch eine Senkung der Inzidenz und Schwere von intraventrikulären Blutungen, periventrikulärer Leukomalazie sowie spastischer Zerebralparese aufzeigen. Allerdings wurden auch Nebenwirkungen, wie eine Erhöhung des zerebralen und peripheren Widerstandes mit Erhöhung des arteriellen Blutdruckes, eine Wachstumsverzögerung sowie Änderungen der zerebralen Erregbarkeit gefunden. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wiesen nach fetaler Betamethasondirektinfusion über 48h zum Zeitpunkt 0,73 und 0,85 der Gestation am Schaffetus eine Senkung der fetalen Hirndurchblutung nach.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde das Tiermodell des „chronisch instrumentierten Schaffeten“ genutzt, das Experimente am nicht anästhesierten Feten in utero ermöglicht. Die Bestimmung der fetalen Hirndurchblutung erfolgte nach Applikation fluoreszierender Mikrosphären mit Hilfe der Referenzprobenmethode.

Da in praxi ein pränataler Glukokortikoidbehandlungszyklus aus zwei maternalen i.m. Injektionen im Abstand von 24h besteht, wurden die Veränderungen der fetalen Hirndurchblutung nach i.m. Betamethasongabe in einer gewichtsadaptierten klinischen Dosis zum Zeitpunkt 0,73 und 0,85 der Gestation untersucht. Dies entspricht der 29. und 34.SSW beim Menschen und liegt damit in einem Zeitraum, in dem routinemäßig Glukokortikoide bei drohender Frühgeburt verabreicht werden. Betamethason erreicht 2 bis 4h nach maternaler Applikation seine Höchstkonzentration in der fetalen Zirkulation, so dass Mikrosphären jeweils 3 sowie 24h nach den Injektionen appliziert wurden. Die Messungen erfolgten im REM-Schlaf, da die fetale Hirndurchblutung schlafstadienabhängig schwankt. Der Einfluss von Betamethason auf die fetale Hirndurchblutung in Abhängigkeit von den Schlafstadien wurde in weiteren Versuchen durch Mikrosphärenapplikation 24 und 24,5h nach der ersten sowie 4 und 4,5h nach der zweiten i.m. Applikation in REM- und NREM-Phasen betrachtet. Glukokortikoide wirken bereits unter normoxischen Bedingungen vasokonstriktorisch auf die Hirngefäße. Daher erwarteten wir eine

Verminderung der zerebralen Reperfusion nach einer Asphyxie, die durch eine repetitive Nabelschnurokklusion hervorgerufen wurde, um eine besonders unter der Geburt auftretende geburtshilfliche Komplikation nachzuempfinden. Die Betamethasongabe erfolgte unter Umgehung der Plazentaschranke wie bei vorherigen Untersuchungen mittels intravenöser fetaler Infusion über 48h.

3 und 24h nach den i.m. Betamethasongaben fand sich keine Veränderung der fetalen Hirndurchblutung, dagegen ließ sich 4 und 4,5h nach der zweiten Gabe schlafstadienunabhängig, d.h. im REM- und NREM-Schlaf, ein Abfall der fetalen Hirndurchblutung nachweisen. Ursächlich scheinen die unterschiedlichen Plasmaprofile nach fetaler und maternaler Gabe zu sein. Bei maternaler Gabe werden deutlich höhere Plasmaspitzen Spiegel erreicht als bei fetaler Direktinfusion. In Übereinstimmung mit den ECoG-Veränderungen, die unter Betamethason nach 6h, jedoch noch nicht nach 2h und nicht mehr nach 18h, messbar sind, vermuten wir nach i.m. Gabe ein Wirkungsfenster von Betamethason auf das zerebrale Gefäßsystem mit einem Beginn frühestens 4h nach der zweiten Injektion und einem Wirkungsverlust innerhalb von 24h. Die vasokonstriktiven Effekte von Betamethason werden vermutlich über eine Hemmung von COX-2, eNOS und iNOS vermittelt.

Während der Asphyxie konnte unsere Arbeitsgruppe mittels Laser-Doppler keine verstärkte Minderdurchblutung im Kortex durch Betamethason messen, jedoch fand sich ein geringerer gegenregulatorischer Anstieg der subkortikalen Durchblutung, was auf eine verminderte Umverteilung des Blutes von kortikalen zu subkortikalen Gebieten schließen lässt. Mittels Mikrosphären wurde in der vorliegenden Arbeit eine Hemmung der späten postasphyktischen Hyperperfusion, nicht jedoch der frühen Reperfusion durch Betamethason festgestellt. Dies mag den klinisch nachgewiesenen Schutz einer pränatalen Betamethasonbehandlung vor intraventrikulären Blutungen erklären. Andererseits konnte unsere Arbeitsgruppe jedoch eine verstärkte, histologisch sichtbare Schädigung von Kortex und Hippokampus ermitteln, was die Vulnerabilität des fetalen Gehirnes gegenüber einer Asphyxie erhöhen würde.

Obwohl Glukokortikoide wahrscheinlich nur eine transiente Senkung der fetalen Hirndurchblutung bewirken, führt uns gerade die Hemmung der postasphyktischen Hyperperfusion, deren funktionelle Konsequenzen kontrovers diskutiert werden, vor Augen, dass die Indikation zu einer pränatalen Glukokortikoidtherapie mit Bedacht gestellt werden sollte.

## 2. Einleitung

### 2.1. Fakten zur Frühgeburtlichkeit

In der westlichen Welt wird fast jedes zehnte Kind zu früh geboren. In Deutschland beträgt die Frühgeborenenrate (Geburt vor der 37.Schwangerschaftswoche) 9% (Frieze et al. 2003), in den USA stieg sie in den vergangenen Jahren auf 14,1% an (Hamilton et al. 2004). Gründe dafür sind zum einen im immer höheren Alter der Mütter zu suchen, andererseits aber auch an der vermehrten Anzahl von Zwillingsschwangerschaften (Warner et al. 2000). Es konnte nachgewiesen werden, dass Mehrlinge ein um 40% erhöhtes Risiko haben, zu früh geboren zu werden (Joseph et al. 2001). Auch Zusammenhänge mit Rauchen, starkem Alkoholkonsum, sozialer Lage, Body Mass Index (BMI) sowie Stress werden angenommen (Allaire und Cefalo 1998, Berkowitz und Papiernik 1993).

Dank antenataler Steroidtherapie, exogener Surfactantgabe und neuer Beatmungsstrategien liegt die Überlebensrate für extrem untergewichtige Kinder unter 1000g bei 70% (Wapner und Waters 2003). Fast 80% aller Babies, die vor der 28.Schwangerschaftswoche (SSW) geboren werden, überleben (Wapner und Waters 2003).

Die häufigste Todesursache in der Neonatalperiode ist nach wie vor das sogenannte Atemnotsyndrom (RDS – respiratory distress syndrome), welches bei 1% aller Neugeborenen auftritt. Bei Frühgeborenen mit weniger als 30 SSW ist die Inzidenz mit 60% deutlich erhöht (von Harnack und Koletzko 1997). In 74% aller neonatalen Todesfälle wird das Baby vor dem Termin geboren. In den USA haben 20-30% aller Kinder, die vor der 35.SSW geboren werden zerebrovaskuläre Schäden, im Vergleich zu einer Inzidenz von zerebrovaskulären Insulten von 1,2% in der Gruppe der über 65jährigen (Yager und Thornhill 1997).

In einer Studie aus Großbritannien, die über 300 Neugeborene untersuchte, die in oder vor der 25.SSW geboren wurden, zeigten 49% eine mehr oder minder schwere neurologische Behinderung und Entwicklungsauffälligkeiten (Wood et al. 2000) Fetale Hirnschädigungen treten zu einem Großteil im Rahmen von hypoxisch-ischämischen Insulten auf, die mit intraventrikulären Blutungen und im Besonderen mit der periventrikulären Leukomalazie verbunden sind (Berger

und Garnier 1998). Auf beide Krankheitsbilder haben Glukokortikoide einen präventiven Einfluss (Ment et al. 1995, Canterino et al. 2001).

## **2.2. Die klinische Bedeutung einer pränatalen Glukokortikoidtherapie**

In den 60er Jahren konnte Liggins in Australien nachweisen, dass die Einleitung der Geburt durch die fetale Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren-Achse (HHN-Achse) gesteuert wird. Umgekehrt führt die Störung der HHN-Achse im noch ungeborenen Schaf zu einem verzögerten Einsetzen der Geburt, einer unterentwickelten fetalen Nebennierenrinde und einer nicht normgerechten Lungenentfaltung (Liggins 1967). Dagegen hatten zu früh geborene Schaffeten, die in utero Glukokortikoiden ausgesetzt waren, weniger Atemprobleme, reifere Lungen und wiesen eine insgesamt geringere Mortalität auf (Liggins 1969). In einer Studie, an der Frauen mit einer Risikoschwangerschaft teilnahmen, konnte Liggins drei Jahre später einen signifikanten Rückgang des RDS unter Glukokortikoidtherapie um bis zu 30% zeigen (Liggins und Howie 1972). Dieser positive Effekt beruht in erster Linie auf Änderungen in der Lungenanatomie in Form von größeren Alveolen und weniger Interstitium (Willet et al. 1999) und einer verstärkten Surfactantproduktion, auch wenn zusätzlich die Produktion einer ganzen Reihe anderer Faktoren, vor allem antioxidativer Enzyme (Katalase, Glutathione Peroxidase, Superoxid Dismutase), induziert wird (Grier und Halliday 2004).

Ein pränataler Glukokortikoidzyklus, bestehend aus zwei intramuskulären Gaben, ist mit einer im Ultraschall sichtbaren Verringerung von intraventrikulären Blutungen und mit einem Trend in Richtung weniger neurologische Behinderungen verbunden (Crowley 2000). Bezüglich der Inzidenz und Schwere intraventrikulärer Blutungen (Ment et al. 1995) und periventrikulärer Leukomalazie (Canterino et al. 2001) besitzen Glukokortikoide außerdem protektive Eigenschaften. Eine pränatale Glukokortikoidtherapie scheint zudem mit einem geringeren Risiko für eine spastische Zerebralparese verbunden zu sein und verbessert insgesamt das Outcome von Frühgeborenen (Vohr et al. 2005).

Seit Anfang der 90er Jahre ist die Glukokortikoidgabe zwischen der 24. bis 34.SSW das Mittel der Wahl bei drohender Frühgeburt in den nächsten 7 Tagen um die Lungenreifung zu beschleunigen (NIH 1995). Seitdem stieg der Anteil

der Mütter, die pränatal mit Glukokortikoiden behandelt werden, von 12-18% auf fast 60% (Elimian et al. 1999). Neuere Studien in den USA sprechen sogar von 75% (Meadow et al. 2003).

Es gibt keine gesicherten Erkenntnisse darüber, wie lang die Wirkung einer pränatalen Glukokortikoidtherapie anhält. Liggins ging bei seinen ersten Untersuchungen davon aus, dass die Wirkung in den ersten 24 Stunden am höchsten ist und dann ungefähr 7-10 Tage anhält (Liggins und Howie 1972). Dies wurde jedoch nie eindeutig nachgewiesen. In der klinischen Praxis wurde versuchsweise damit begonnen, die Wirkung eines einmaligen Behandlungszyklus, bestehend aus zweimal 12mg Betamethason intramuskulär, im Abstand von 24 Stunden, durch mehrfache Zyklen zu verlängern. Mittlerweile gibt es jedoch fast 20 randomisierte kontrollierte Tierstudien, die die Einzel- und Mehrfachgabe bezüglich der Wirkung auf Lunge, Gehirn oder Wachstum miteinander vergleichen (Aghajafari et al. 2002). Weder in diesen Tierstudien (Aghajafari et al. 2002) noch beim Menschen (Wijnberger et al. 2002) wurden dabei statistische Verbesserungen bezüglich neonataler Sterblichkeit, RDS, intraventrikulärer Blutungen und nekrotisierender Enterokolitis im Vergleich zur Einzelgabe festgestellt. Experimentell konnten sogar negative Effekte auf verschiedene Organsysteme gefunden werden (Aghajafari et al. 2002). Deswegen wird heutzutage empfohlen, außerhalb von klinischen Studien keine wiederholten pränatalen Glukokortikoidgaben durchzuführen (Committee on Obstetrics 2002).

### **2.3. Die Funktion der fetalen Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse**

#### **2.3.1. Die Veränderungen des fetalen Kortisolspiegels während der Schwangerschaft**

Während der Schwangerschaft ist der Fetus nur sehr geringen Kortisolspiegeln ausgesetzt (Fowden 1995). Es wird angenommen, dass dieses Kortisol allein von der Mutter stammt (Hennessy et al. 1982), da auch die Genexpression wichtiger Schlüsselenzyme der fetalen Steroidhormonsynthese, insbesondere die 17 $\alpha$ -Hydroxylase, zu diesem Zeitpunkt ausgeschaltet ist (Tangalakakis et al. 1989).

Erst sehr spät, beim Schaf ungefähr am 125. Gestationstag (Gestationsdauer 150 Tage), also zum Zeitpunkt 0,83 der Schwangerschaft, beginnt die fetale HHN-Achse zu reifen (Challis et al. 2001). Die Reifung der HHN-Achse ist mit dem exponentiellen Anstieg von Adrenokortikotropem Hormon (ACTH) und Kortisol in der fetalen Zirkulation verbunden. Auch die Expression der für das Corticotropin releasing hormone (CRH) kodierenden mRNA im Hypothalamus, sowie Proopiomelanocortin in der Hypophyse und der Schlüsselenzyme der Steroidhormonproduktion in der Nebenniere steigen an (Challis et al. 2001). Mit fortschreitender Schwangerschaft kommt es weiterhin zu einer Östrogen-induzierten Up-Regulation von 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2 (11 $\beta$ -HSD 2) in der Plazenta, die eine Barriere für mütterliche Glukokortikoide darstellt und damit deren Passage erschwert (Benediktsson et al. 1997, Shams et al. 1998, Burton und Waddell 1999, Krozowski 1999). Synthetische Glukokortikoide wie Betamethason oder Dexamethason (Siebe et al. 1993) haben auf Grund von spezifischen strukturellen Unterschieden eine geringe Affinität für die 11 $\beta$ -HSD 2 (Benediktsson et al. 1997).

Zum Ende der Schwangerschaft bewirken hohe Kortisolkonzentrationen die verstärkte Expression der Prostaglandin-Synthase-Typ-2 und der 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase in Trophoblastzellen des Chorions. Die erhöhte Synthese und der verringerte Metabolismus von Prostaglandinen führen zu einem verstärkten Output von Prostaglandinen, was wiederum die Aktivität der 11 $\beta$ -HSD 1 in menschlichen fetalen Membranen erhöht. 11 $\beta$ -HSD 1 steigert die lokale Bildung von Kortisol aus Kortison und stimuliert ferner die Produktion von Prostaglandinen mittels para- und autokriner Mechanismen (Übersicht in Challis et al. 2001).

Die steigenden Kortisolkonzentrationen führen zum einen zur Reifung von Lungen und anderen Organen, werden aber auch von einer Wachstumsverlangsamung begleitet und gehören zu einer Reihe von Ereignissen, die Mutter und Kind auf die Geburt vorbereiten (Newnham und Moss 2001). Parallel zum Anstieg des Kortisols im Blut des Fetus kommt es auch zu einem Anstieg des fetalen Blutdrucks (Tangalakis et al. 1992, Dodic und Wintour 1994, Schwab et al. 2000) als Ausdruck der Reifung des kardiovaskulären Systems.

### 2.3.2. Glukokortikoidrezeptoren

Im Gehirn finden sich zwei Typen von Rezeptoren, die Glukokortikoide binden (Übersicht in De Kloet et al. 1999): Typ-1-Rezeptoren oder Mineralokortikoidrezeptoren (MR), die Kortikosteron und Kortisol mit sehr hoher Affinität binden, und Typ-2-Rezeptoren oder Glukokortikoidrezeptoren (GR), für die Kortisol nur 1/10 der Affinität besitzt. Neuronen im Hippokampus besitzen sowohl MR als auch GR, während in allen übrigen Hirnregionen hauptsächlich GR enthalten sind. Erst bei steigenden Steroidkonzentrationen, beispielsweise in Stresssituationen, kommt es nach Sättigung der MR zu einer verstärkten Bindung von Kortisol an GR, die normalerweise nicht voll besetzt sind. Niedrige Kortisolspiegel, bei denen hauptsächlich Typ-1-Rezeptoren gesättigt sind, haben eher einen neuroprotektiven Effekt, währenddessen hohe Kortisolspiegel über eine Aktivierung der Typ-2-Rezeptoren neurotoxische und Apoptose induzierende Wirkungen ausüben (Hassan et al. 1996). Kortikosteroidrezeptoren sind intrazelluläre Rezeptoren, die nach ihrer Aktivierung in den Zellkern gelangen, an spezielle Andockmechanismen im transkriptionsregulierten Bereich binden und die Genexpression und damit die Synthese bestimmter Proteine regulieren. Die synthetischen Glukokortikoide Betamethason und Dexamethason binden selektiv an Typ-2-Rezeptoren, die ubiquitär im gesamten Gehirn sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen vorhanden sind (Vielkind et al. 1990).

### 2.4. Nichtpulmonale Glukokortikoideffekte

Eine pränatale Glukokortikoidbehandlung ist mit einer Reihe von Nebenwirkungen assoziiert. Neben metabolischen Effekten, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, betreffen sie sowohl das kardiovaskuläre (2.4.1.) und zerebrovaskuläre (2.4.2.) System, als auch Hirnfunktion und Struktur des Gehirns (2.4.3.). Glukokortikoide bewirken zudem typischerweise eine allgemeine Wachstumsverzögerung. Dies wird in einem verringerten Geburtsgewicht (French et al. 1999, Kutzler et al. 2004), einem verminderten Hirngewicht (Kutzler et al. 2004) und einem reduzierten Kopfumfang (Guinn et al. 2001) deutlich. Auch die Myelinisierung im zentralen Nervensystem ist verzögert (Dunlop et al. 1997). Ursächlich zugrunde liegt vermutlich ein unspezifischer positiver Effekt der Glukokortikoide auf die Zelldifferenzierung

zuungunsten einer weiteren Zellteilung, was sich auch in der Reifung der Lunge widerspiegelt.

#### **2.4.1. Pränatale Glukokortikoideffekte auf das kardiovaskuläre System**

Im letzten Drittel der Schwangerschaft kommt es beim Schaf physiologischerweise zu einem kontinuierlichen Anstieg des arteriellen Blutdruckes (Boddy et al. 1974, Dawes et al. 1994) und einem kontinuierlichen Abfall der Herzfrequenz des Fetus (Unno et al. 1999). Ersteres resultiert aus einer erhöhten kardialen Auswurfleistung und einer Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes (Unno et al. 1999), der Abfall der fetalen Herzfrequenz versteht sich dagegen möglicherweise als Baroreflexantwort auf den angestiegenen Blutdruck (Itskovitz et al. 1983). Die Reifung des vaskulären Systems ist wahrscheinlich durch den Kortisolanstieg bedingt (2.3.1.). So kann zum Beispiel durch eine Adrenalectomie der physiologische Blutdruckanstieg verhindert werden (Unno et al. 1999).

Im peripheren kardiovaskulären System agieren Glukokortikoide als direkte Vasokonstriktoren auf die Widerstandsgefäße (Derks et al. 1997) und steigern durch die Tonuserhöhung den Blutdruck. Sowohl bei kontinuierlicher intravenöser Zufuhr (Tangalakakis et al. 1992, Derks et al. 1997, Schwab et al. 2000) als auch bei maternaler intramuskulärer Gabe (Bennet et al. 1999) konnte beim Schaf ein Anstieg des fetalen mittleren arteriellen Blutdrucks nach Gabe von Glukokortikoiden festgestellt werden. Dieser Effekt kann auch an Primaten reproduziert werden (Koenen et al. 2002) und scheint damit für den Menschen wahrscheinlich.

Bei Glukokortikoidgabe 24 bis 48 Stunden vor der Geburt fand sich beim Schaf direkt postnatal ein Anstieg des Blutdrucks und der kardialen Auswurfleistung, sowie eine Erhöhung der Kontraktilität des linken Ventrikels (Padbury et al. 1995). Eine signifikante Erhöhung des Blutdruckes wurde bei neugeborenen Babies, die intrauterin Glukokortikoiden ausgesetzt waren, innerhalb der ersten Lebensstunden nachgewiesen (Demarini et al. 1999).

Die Pathogenese der Glukokortikoid-induzierten peripheren Vasokonstriktion ist multifaktoriell. Es ist bekannt, dass die periphere Widerstandserhöhung einerseits durch einen direkten Angriff am Gefäßendothel zustande kommt, da auch dort Glukokortikoidrezeptoren vorkommen (Walker et al. 1992). Indirekt zeigen die kleinen fetalen Femoralarterien eine stärkere Reaktion auf



vasoaktive Substanzen, wie  $K^+$  (Anwar et al. 1999) oder Endothelin-1 (Docherty et al. 2001). Der  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Gefäßmuskelzellen steigt (Kornel et al. 1993). Die Aktivität von Vasodilatoren wie Prostaglandinen und Stickstoffmonoxid (NO), sowie des Kinin-Kallikrein-System wird dagegen vermindert (Saruta 1996). Katecholamine scheinen keine besondere Rolle bei der Entstehung der Glukokortikoid-bedingten Vasokonstriktion zu spielen, da deren Plasmakonzentrationen nach Dexamethasongabe sanken (Derks et al. 1997).

#### **2.4.2. Pränatale Glukokortikoideffekte auf das zerebrovaskuläre System**

Auf die zerebralen Gefäße und damit auf die Durchblutung des fetalen Gehirns haben Glukokortikoide ebenfalls einen Einfluss. Bei Ratten ließ sich nach einer Langzeitbehandlung mit Glukokortikoiden eine signifikant erniedrigte Durchblutung im Hippokampus feststellen, verbunden mit schweren histologisch nachweisbaren Schäden (Endo et al. 1997), währenddessen eine Adrenalektomie, wahrscheinlich aufgrund des Mangels an Kortikosteron, des natürlich vorkommenden Glukokortikoids bei Ratten, zu einem Anstieg der hippokampalen Durchblutung führte (Endo et al. 1994).

In unserer Arbeitsgruppe konnte beim chronisch instrumentierten Schaffeten, einem bedeutenden Modell der menschlichen Fetalperiode, sowohl am 110. Trächtigkeitstag (0,73 der Gestation) als auch am 128. Trächtigkeitstag (0,85 der Gestation), eine Reduktion der fetalen Hirndurchblutung um durchschnittlich 25-30% nachgewiesen werden (Schwab et al. 2000, Löhle et al. 2005). Dies entspricht beim Menschen ungefähr der 29. und 34.SSW. Damit ist der Effekt vom Gestationsalter unabhängig und lässt sich sowohl vor als auch nach dem vorgeburtlichen physiologischen Kortisolanstieg (siehe 2.3.1.) feststellen. Die Glukokortikoidgabe erfolgte mittels direkter kontinuierlicher intravenöser Infusion, um die Plazentaschranke zu umgehen. Dabei wurden fetale Plasmakonzentrationen erreicht, die der im Plasma der humanen Nabelschnur 24 Stunden nach mütterlicher Glukokortikoidbehandlung glichen (Petersen et al. 1980, Kream et al. 1983). Der Durchblutungsabfall wurde durch einen Anstieg des zerebralen Gefäßwiderstandes vermittelt und führte zu einem verminderten zerebralen Sauerstoffangebot.

Während einer Asphyxie, hervorgerufen durch repetitive Nabelschnurokklusionen, führt Betamethason allerdings nicht zu einer

zusätzlichen Minderdurchblutung, wie unsere Arbeitsgruppe ebenfalls bei Schaffeten mittels Laser Doppler Flowmetry zeigen konnte. Indessen fand sich eine verringerte Umverteilung der Durchblutung von kortikalen zu subkortikalen Arealen (Müller et al. 2006). Die Lasermessungen zeigten einen Abfall der kortikalen Hirndurchblutung während der Asphyxie sowohl in Kontroll- als auch Betamethasongruppe. Die Redistribution des Blutes zum Subkortex war in der Kontrollgruppe deutlich höher als in der Betamethasongruppe, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Betamethason die Umverteilung des Blutes vom Kortex zum Subkortex vermindert.

Die bisherigen Forschungen den menschlichen Fetus betreffend sind uneinheitlich. Dopplersonographisch konnte man nach Dexamethason- (Cohlen et al. 1996) und Betamethasongabe (Rotmensch et al. 1999) keine hämodynamischen Veränderungen feststellen, weder in den Aa. umbilicales et uterinae, noch in der fetalen Aorta, den Aa. renales oder den zerebralen Arterien. Allerdings gibt es auch eine Studie (Edwards et al. 2002), in der nach Betamethasonapplikation der Pulsatilitätsindex, ein berechneter Parameter aus den gemessenen Geschwindigkeiten und ein Maß für die Vasodilatation, in der fetalen Aorta und in der A.cerebri media signifikant abnahm. Cabanas et al. konnten signifikante Anstiege der enddiastolischen Flussgeschwindigkeiten um 72% in der A.carotis interna, um 102% in der A.cerebralis anterior und um 84% in der A.ophtalmica zwischen der 1. und 5. postnatalen Glukokortikoiddosis bei beatmeten Frühgeborenen nachweisen (Cabanas et al. 1997).

#### **2.4.3. Pränatale Glukokortikoideffekte auf das Gehirn**

Zahlreiche Untersuchungen konnten im adulten Organismus Glukokortikoideffekte auf Kognition, Vigilanz, Gedächtnis und Emotionen belegen (Lupien und McEwen 1997) und, obwohl Kortisol für eine normale Reifung des zentralen Nervensystems essentiell ist (De Kloet et al. 1999), wissen wir, dass vorgeburtlicher Stress, der mit erhöhten Glukokortikoidkonzentrationen einhergeht, Lernen, Angst und soziales Verhalten beeinträchtigt (Kofman 2002). Auch nach einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung haben sich zerebrale Nebenwirkungen sowohl auf die Hirnfunktion als auch auf die strukturelle Form des Gehirnes gezeigt (2.4.3.1. und 2.4.3.2.). Glukokortikoide beeinflussen weiterhin die kognitive und psychomotorische Entwicklung von Frühgeborenen, gleichwohl finden sich

Widersprüche in den einzelnen Studien. Beim Menschen unterscheiden sich die Ergebnisse besonders in Hinsicht auf Ein- und Mehrfachgabe. Einerseits waren Mehrfachgaben bei Kindern mit einem Geburtsgewicht unter 1500g mit einer Verzögerung der psychomotorischen Entwicklung assoziiert (Esplin et al. 2000), andererseits führte ein einfacher Behandlungszyklus zu einem verbesserten psychomotorischen Outcome (Kent et al. 2005, Vohr et al. 2005).

#### **2.4.3.1. Glukokortikoideffekte auf die fetalen Verhaltenstadien**

Vor über 50 Jahren wurde entdeckt, dass der Schlaf in zwei verschiedenen Stadien auftreten kann: Rapid-Eye-Movement (REM) Schlaf, auch Aktivschlaf genannt, und Non-Rapid-Eye-Movement (NREM) Schlaf oder Tiefschlaf (Aserinsky und Kleitman 1953). Der Nachweis von Verhaltensstadien gelingt beim menschlichen Feten mittels Ultraschall und Kardiotokographie (CTG) (Nijhuis et al. 1982). Aufgrund der fehlenden Möglichkeit der Ableitung der elektrokortikalen Hirnaktivität beim menschlichen Feten sind sie ein wichtiges klinisches Kriterium für die Beurteilung der Hirnfunktion und des fetalen Vitalzustandes in utero.

Beim Menschen kommt es ab der 26.SSW zum Auftreten von Schlafstadien (Selton et al. 2000). Wir unterscheiden beim menschlichen Feten vier verschiedene Verhaltensstadien, die durch veränderte Herzfrequenz, Augen- und Körperbewegungen charakterisiert sind:

- 1F (Tiefschlaf): nur gelegentlich Körperbewegungen, keine Augenbewegungen, regelmäßige Atembewegungen, geringe Herzfrequenzvariabilität und keine Akzelerationen im CTG
- 2F (Aktivschlaf): konstante Augenbewegungen, regelmäßige Körperbewegungen, Herzfrequenzvariabilität mit großer Oszillationsbreite und gelegentliche Akzelerationen im CTG
- 3F (Ruhig-Wachzustand oder „quiet alertness“): kaum Körperbewegungen, konstante Augenbewegungen, breite Oszillationen und keine Akzelerationen im CTG
- 4F (Aktiv-Wachzustand): zahlreiche Körperbewegungen, konstante Augenbewegungen, instabile Herzfrequenz mit ausgeprägten Akzelerationen.

Ein Fetus in der 38.SSW verbringt etwa 75% der Zeit im Stadium 1F und 2F (Nijhuis et al. 1982). Der Umfang des REM-Schlafes ist dabei beim Feten

bedeutend höher als bei Erwachsenen (Peirano et al. 2003). Im Laufe der weiteren Entwicklung, die sich sowohl vor der Geburt als auch postnatal vollzieht, verändern sich die Anzahl, als auch die Dauer von Schlafphasen.

Trotzdem das Gehirn des Schafes, einem bedeutenden Tiermodell für die menschliche Schwangerschaft, zum Zeitpunkt der Geburt einen höheren Reifungsgrad als das menschliche Gehirn aufweist (Astrom 1967, Dobbing und Sands 1979), ist die Entwicklung von REM- und NREM-Schlaf mit dem Menschen vergleichbar. Hier lassen sich ab dem 115. Trächtigkeitstag (0,8 der Gestation) Schlafstadien differenzieren (Szeto und Hinman 1985). Beim Schaffeten werden REM- und NREM-Schlaf, die den Stadien 1F und 2F entsprechen, sowie „indeterminate Perioden“, bei denen die Einordnung in die Schlafstadien schwerfällt, unterschieden (McNerney und Szeto 1990).

Eine Aktivierung des Kortex während des REM Schlafes geht zum einen mit einem Anstieg des oxidativen Stoffwechsels (Abrams et al. 1990, Richardson et al. 1985), als auch mit einer erhöhten Hirndurchblutung einher (Jensen et al. 1986, Abrams et al. 1990, Richardson et al. 1994). Die Glukoseaufnahme ist im REM-Schlaf um bis zu 37% höher als im NREM-Schlaf (Chao et al. 1989). Zudem fand man bei Katzen im REM-Schlaf Veränderungen des Glukosemetabolismus im Thalamus, im limbischen System und in spezifischen Regionen der pontinen retikulären Formation (Lydic et al. 1991).

Unsere Arbeitsgruppe konnte eine akute Abnahme der Komplexität des kortikalen Elektroenzephalogramms (ECoG) im REM-Schlaf bei instrumentierten Schaffeten innerhalb von 24 Stunden nach einer Betamethasongabe nachweisen (Schwab et al. 2001b). Parallel dazu fand sich eine akute Verzögerung von akustisch evozierten Potenzialen (AEPs) beim menschlichen Feten, gemessen in utero mittels Magnetenzephalographie (Schleussner et al. 2004).

Bei menschlichen Feten werden nach maternaler Betamethasongabe abnehmende fetale Körper- und Atembewegungen sowie eine verringerte Herzfrequenz beobachtet (Jackson et al. 2003, Mulder et al. 2004, Rotmensch et al. 2005). Die Reduktion der fetalen Körperbewegungen beträgt bis zu 50% und die fetalen Atembewegungen sistieren am zweiten Tag nach der Betamethasonapplikation mitunter völlig (Derks et al. 1995).

#### **2.4.3.2. Glukokortikoideffekte auf die fetale Hirnstruktur**

Die Dexamethasongabe induziert bei jugendlichen Rhesusaffen die Degeneration und den irreversiblen Verlust von hippokampalen Neuronen bei erhöhten Kortisolspiegeln, wie wir es auch beim Alterungsprozess finden (Sapolsky 1985, Uno et al. 1994). Im sich entwickelnden Rattengehirn wurde weiterhin eine glukokortikoidbedingte Hemmung der Neuro- und Gliagenese sowie der Myelinisierung (De Kloet et al. 1999) beobachtet. Diese beruht wahrscheinlich auf einer Hemmung der Proliferation von Präkursoren der myelinbildenden Oligodendroglia (Alonso 2000). Von unserer Arbeitsgruppe ließ sich nach pränataler Betamethasonapplikation ein akuter Verlust von Mikrotubulus assoziierten Proteinen (MAP1B und MAP2) im fetalen Schaf- und Primatengehirn nachweisen (Schwab et al. 2001a, Antonow-Schlorke et al. 2003a). MAP's sind neuronale Zytoskelettproteine, die wesentlich für Synaptogenese und die Stabilisierung des neuronalen Netzwerkes sind (Tucker 1990). Eine Abnahme von MAP's gilt als Hinweis für eine frühe intrazelluläre, strukturelle Störung infolge verschiedenster neuronaler Schädigungen (Bywood und Johnson 2000). Parallel dazu fand sich eine Abnahme von Synaptophysin, einem in den präsynaptischen Terminals neokortikaler Neurone lokalisierten  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Glykoprotein, welches als struktureller Bestandteil der Synapsen ein Marker für die Synapsendichte ist und zur Synaptogenese korreliert (Schwab et al. 2001a, Antonow-Schlorke et al. 2003a).

Im adulten Gehirn finden sich akut neurotoxische Effekte (Sapolsky 1985, McEwen et al. 1995) und Apoptose (Hassan et al. 1996) der Hirnzellen bereits nach physiologisch erhöhten Plasmakonzentrationen von Kortisol. Exogene Glukokortikoide scheinen im adulten Gehirn zumindest zu einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber metabolischen und toxischen Insulten zu führen (Sapolsky 1994).

#### **2.5. Die Bedeutung einer intrauterinen Asphyxie für den von Frühgeburt bedrohten Fetus**

Die Inzidenz einer intrauterinen Asphyxie beträgt bei reifen Neugeborenen 1-2/1000, dagegen erreicht sie fast 60% bei allen Kindern mit einem extrem niedrigen Geburtsgewicht (Ottaviano et al. 2001). In der Neugeborenenperiode sterben zwischen 20 und 50% aller asphyktischen Kinder (Vannucci 2000). Bis

zu 25% der Überlebenden weisen neuropsychologische Behinderungen auf, meist in Form von Schlaganfällen verbunden mit mentaler Retardierung, Lernschwierigkeiten oder Epilepsie (Vannucci 2000). Schwere intrauterine Asphyxien führen zu hypoxisch-ischämischen Insulten, die je nach Ausmaß und Lokalisation des Insultes mit spastischen Paresen, Choreoathetosen, Ataxien und sensomotorischen Integrationsstörungen verbunden sind (Übersicht in Berger und Garnier 1998).

Klinisch gesehen sind Sauerstoffmangelzustände placentaren Ursprungs oder treten im Rahmen von Nabelschnurkomplikationen (Berger und Garnier 1998) infolge von Uteruskontraktionen (Dawes et al. 1993), Oligohydramnions (Gabbe et al. 1976) oder Nabelschnurumschlingungen um den Hals (Anyaegebunam et al. 1986, Dawes et al. 1993) auf. Letztere sind in 25% aller Schwangerschaften zum Zeitpunkt der Geburt anzutreffen (Collins et al. 1995), ohne dabei scheinbar häufiger zu Asphyxien zu führen. Eine chronische oder intermittierende Unterbrechung der Nabelschnurdurchblutung und damit der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung ist intrauterin häufige Ursache einer Wachstumsretardierung (Osak et al. 1997).

### **2.5.1. Effekte einer perinatalen Asphyxie auf das Gehirn**

Zur Aufrechterhaltung eines ausgewogenen Verhältnisses zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch auch während hypoxischer Stressphasen kommt es beim Feten zu einer Blutumverteilung zugunsten kritischer Organe, wie dem Gehirn, und zu einer regulierten Reduktion der Stoffwechselrate, bevor die Sauerstoffreserven vollständig ausgeschöpft sind (Ashwal et al. 1984, Asakura et al. 1990, Bennet et al. 1998, Singer 1999, Jensen et al. 1999). Diese Zentralisierung des Kreislaufes bewirkt über Chemo- und Barorezeptormechanismen und die Stimulierung von kardialen Mechanorezeptoren einen Abfall der Herzfrequenz, gefolgt von einer Tachykardie (Siassi et al. 1979, Itskovitz et al. 1983, Green et al. 2001). Die Aktivierung des Sympathikus durch die Stimulierung der arteriellen Chemorezeptoren sowie die ACTH-, Cortisol-, Vasopressin- und Reninausschüttung (Giussani et al. 1994) bewirken weiterhin eine periphere Vasokonstriktion (Giussani et al. 1997) und eine Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes (Roelfsema et al. 2005). Dies führt zu einem variablen Anstieg des Blutdruckes.

Schwere Asphyxien, beispielsweise im Rahmen von Nabelschnurokklusionen, gehen mit einer Azidose, einer Hyperkapnie und einer Hypoxie des Gewebes einher (Bennet et al. 1998, Hunter et al. 2003). Asphyxien verursachen oxidativen Stress, Lipidperoxidation und Zelltod (Castillo-Melendez et al. 2004). Das fetale Gehirn reagiert auf einen moderaten Sauerstoffmangel mit einer Erhöhung der Durchblutung (Purves und James 1969, Jones et al. 1978, Ashwal et al. 1984, Bishai et al. 2003). Neben einer Blutdruckerhöhung kommt es zu einer Vasodilatation des zerebralen Gefäßbettes (Johannsson und Siesjö 1975). Die Sauerstoffabgabe an das Gehirn auf Kosten peripherer Gewebe steigt an (Jensen et al. 1999). Bei einer über längere Zeit persistierenden Asphyxie, ist der Fetus dagegen nicht in der Lage die Kreislaufzentralisation aufrechtzuerhalten. Eine extreme Asphyxie führt zu einer Erniedrigung der kortikalen Hirndurchblutung und des Sauerstoffverbrauches (Hunter et al. 2003, Field et al. 1990). Das Blut wird in Richtung Hirnstamm umgelenkt, um autonome Funktionen auf Kosten von Zerebrum und choroidalem Plexus aufrechtzuerhalten (Jensen et al. 1999). Nach Beendigung der Asphyxie kommt es zu einem postasphyktischen Anstieg der Hirndurchblutung, der je nach Ausmaß des Sauerstoffmangels und Reife des betroffenen Feten das zwei- bis dreifache des Ausgangswertes betragen kann (Pryds et al. 1990, Jensen und Berger 1991, Marks et al. 1996b, Raad et al. 1999).

Das Vorhandensein, die Schwere und der Verlauf der histopathologisch nachweisbaren Hirnläsionen, die aus einer perinatalen Hypoxie-Ischämie entstehen, hängen insbesondere vom Alter des Feten ab. Zu Beginn der Myelinisierung, zwischen 23. und 32.SSW (Volpe 2000), ist die weiße Substanz besonders vulnerabel gegenüber hypoxischen Schädigungen. Wird die weiße Substanz dorsal und lateral der Seitenventrikel geschädigt, spricht man von einer so genannten periventrikulären Leukomalazie (Berger und Garnier 1998). Als Ursache der periventrikulären Leukomalazie wird eine Minderdurchblutung bei starkem Blutdruckabfall angesehen wird (Jorch 1997). Bei reifen Neugeborenen jenseits der 32.SSW nimmt die Vaskularisation der weißen periventrikulären Substanz erheblich zu, so dass die zerebralen Läsionen nun mehr in der grauen Substanz lokalisiert sind (Barkovich 1992). Vor allem im Hippokampus und im parasagittalen Kortex sind selektive Zelluntergänge zu finden (Berger und Garnier 1998). Tierexperimentell führen sowohl einzelne (Mallard et al. 1992, Fujii et al. 2003), als auch wiederholte

Nabelschnurokklusionen (Mallard et al. 1995, Ohyu et al. 1999, Marumo et al. 2001) zu histologisch sichtbaren Hirnschäden, besonders im Hippokampus (Mallard et al. 1992, Fujii et al. 2003), im Striatum (Mallard et al. 1995) und in der weißen Substanz (Marumo et al. 2001, Ohyu et al. 1999). Der fetale Hirnstamm dagegen wird von strukturellen und neurochemischen Veränderungen während einer Hypoxie weitgehend verschont (Tolcos et al. 2003).

Auf Zellniveau kommt es durch den akuten Sauerstoffmangel zu einem Stillstand der oxidativen Phosphorylierung im Gehirn. Der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe fehlt die Energie, um den Ionengradienten aufrechtzuerhalten und so erfolgt über (voltage-dependent)  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und Glutamat-regulierte Ionenkanäle der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle. Dieser sogenannte „Kalzium-Overload“ führt durch Aktivierung von Proteasen, Lipasen und Endonukleasen zu Zellschäden. Nach Ende der ischämischen Periode bleibt die Proteinsynthese in vulnerablen Zellen unterdrückt, so dass dies als früher Indikator für einen neuronalen Zelltod dienen kann. Zu einer zweiten Schädigung der Zellen kommt es während der postischämischen Reperfusion. Sauerstoffradikale werden freigesetzt (Bagenholm et al. 1998), Stickstoffmonoxid (NO) synthetisiert, eine Entzündung entsteht und teilweise werden die Zellen apoptotisch (Übersicht in Berger und Garnier 1998).

### **2.5.2. Glukokortikoideffekte auf das fetale Gehirn während und nach einer perinatalen Asphyxie**

Ähnlich wie die postnatale Gabe von Glukokortikoiden mit der erhöhten Inzidenz einer spastischer Zerebralparese assoziiert ist (Shinwell et al. 2000, Barrington et al. 2001) und die pränatale Glukokortikoidgabe bei Kindern mit einem extrem niedrigen Geburtsgewicht mit einem verringerten Risiko für eine spastische Zerebralparese einherzugehen scheint (Vohr et al. 2005), finden sich Widersprüche bei Betrachtung der Glukokortikoidwirkungen auf das fetale Gehirn während einer perinatalen Asphyxie.

Glukokortikoide scheinen einerseits einen protektiven Effekt gegenüber einer hypoxisch-ischämischen Belastung zu haben (Liu et al. 1995). Dies ist bei Ratten am 7.Tag postnatal, wenn Myelinisierung und Synaptogenese noch nicht abgeschlossen sind, nachweisbar (Tuor 1997). Eine wichtige Rolle spielt dabei die Glukosekonzentration. Im Gegensatz zum adulten Gehirn, wo erhöhte



Glukosespiegel aufgrund des Laktatanstiegs und des darauffolgenden pH-Abfalls im Rahmen der anaeroben Glykolyse zu einer Exazerbation der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung führen (Pulsinelli et al. 1982), steht bei Feten nicht der Sauerstoff-, sondern der Substratmangel im Vordergrund (Rosenberg und Murdaugh 1990). Die glukokortikoidbedingte Verminderung der Glukoseaufnahme in die Zelle während eines verminderten Substratangebotes und die damit erhöhten Blutglukosespiegel tragen im fetalen Gehirn zur Aufrechterhaltung der Hirndurchblutung und des Sauerstoffverbrauches während Asphyxie und Reperfusion bei (Rosenberg und Murdaugh 1990). Glukokortikoide wirken dabei durch die Erniedrigung des Stoffwechselbedarfs und die erhöhte Bereitstellung von Hochenergiephosphaten wie Adenosintriphosphat (ATP) und Glukose neuroprotektiv (Tuor 1997). Eine Bestätigung dessen liefern Vannucci et al., die zeigen konnten, dass unreife hyperglykämische Ratten einen deutlich geringeren Hirnschaden nach einem ischämischen Insult entwickelten als normoglykämische (Vannucci et al. 1996). Andererseits scheinen Glukokortikoide die Vulnerabilität der Neurone (Sapolsky 1994) und der Glia (Tombaugh und Sapolsky 1992) zu erhöhen. So wurde sowohl bei adulten (Koide et al. 1986) als auch bei neonatalen Ratten (Sapolsky und Pulsinelli 1985, Kauffman et al. 1994, Carlos et al. 1991) durch Glukokortikoide eine Verstärkung der Hirnschädigung nach einem hypoxisch-ischämischen Insult festgestellt. Dies liegt möglicherweise an einer erhöhten Konzentration exzitatorischer Aminosäuren (McEwen 1994), die vor allem über NMDA-Rezeptoren im Hippokampus (Supko und Johnston 1994) oder im Mittelhirn (Cho und Little 1999) neurotoxisch wirken.

### 3. Ziele der Arbeit

Die Gabe von Glukokortikoiden erhöht die Überlebenschance von Frühgeborenen aufgrund einer Verbesserung der Lungenfunktion (Ballard und Ballard 1995). Seit längerem gibt es Hinweise auf nichtpulmonale Nebeneffekte insbesondere auf das vaskuläre System. Im Gegensatz zu den gut untersuchten kardiovaskulären Effekten (2.4.1.), sind die Daten zu zerebrovaskulären Glukokortikoidwirkungen jedoch spärlich (2.4.2.).

Die direkte fetale Betamethasoninfusion unter Umgehung der Plazentaschranke führt beim Schaffeten zu einer Senkung der Hirndurchblutung zum Zeitpunkt 0,73 und 0,85 der Gestation. Der Effekt ist damit unabhängig von der in diesem Zeitraum stattfindenden Reifung des kardiovaskulären Systems und der HHN-Achse (Schwab et al. 2000, Löhle et al. 2005). Unklar ist, welche Effekte nach maternalen i.m. Betamethasonapplikation, wie in der klinischen Praxis üblich, bei der wesentlich höhere Betamethasonspitzenplasmakonzentrationen erreicht werden, auftreten und inwieweit die schlafstadienabhängigen Schwankungen der fetalen Hirndurchblutung durch Glukokortikoide verändert werden. Obwohl Glukokortikoide bereits unter normoxischen Bedingungen vasokonstriktorisch wirken, findet sich keine zusätzliche Abnahme der fetalen Hirndurchblutung im Verlaufe einer Asphyxie, allerdings eine Minderung der zerebralen Umverteilung von kortikalen zu subkortikalen Arealen (Müller et al. 2006). Unbekannt ist jedoch, ob eine Glukokortikoidgabe die zerebrale Reperfusion nach einer fetalen Asphyxie, wie sie häufig durch eine Nabelschnurokklusion hervorgerufen wird und unter der Frühgeburt vorkommt, verstärkt.

#### **Zur Klärung dieser Fragen, untersuchten wir folgende Hypothesen:**

1. Eine maternale Glukokortikoidbehandlung in der in der klinischen Praxis üblichen Dosis führt zu einer Senkung der fetalen Hirndurchblutung, da auch eine fetale Direktinfusion eine fetale Hirndurchblutungssenkung bewirkt und synthetische Glukokortikoide nach bisherigem Wissen die Plazentaschranke überqueren können.
2. Dieser Effekt ist wie nach fetaler intravenöser Direktinfusion im letzten Trimenon nicht vom Gestationsalter und damit von der Reifung des kardiovaskulären Systems und der Stressachse abhängig.

3. Pränatal gegebene Glukokortikoide verändern die schlafstadienabhängigen Schwankungen der fetalen Hirndurchblutung.
4. Auf Grund ihrer vasokonstriktorisches Eigenschaften vermindern Glukokortikoide die zerebrale Reperfusion nach einer Asphyxie und erhöhen damit die Vulnerabilität des Gehirnes gegenüber einem asphyktischen Insult.

Die Messung der Hirndurchblutung erfolgte mit Hilfe fluoreszierender Mikrosphären. Betamethason wurde dem Mutterschaf im klinischen Routineapplikationsmuster, d.h. zweimal im Abstand von 24h in der klinisch zur Förderung der Lungenreifung verwendeten Dosis gewichtsadaptiert intramuskulär injiziert. Nur bei den Asphyxieversuchen wurde Betamethason unter Umgehung der Plazentaschranke mittels kontinuierlicher fetaler Direktinfusion mit einer Rate von  $3,3 \mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$  wie bei vorherigen Untersuchungen verabreicht, so dass insgesamt niedrigere Plasmakonzentrationen erreicht wurden (Schwab et al. 2000, Löhle et al. 2005). Die Untersuchungen zur Senkung der fetalen Hirndurchblutung unter normoxischen Bedingungen erfolgten vor und während des physiologischen vorgeburtlichen Kortisolanstiegs zum Zeitpunkt 0,73 und 0,85 der Gestation, entsprechend der 29. und 34.SSW beim Menschen. Die Experimente zur Messung der schlafstadienabhängigen Schwankungen der fetalen Hirndurchblutung wurden nur zum Zeitpunkt 0,85, entsprechend der 34.SSW, durchgeführt, da zum Zeitpunkt 0,73 der Gestation noch keine Schlafstadien nachzuweisen sind. Ebenso erfolgten die Asphyxieversuche zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation. Alle Untersuchungen wurden in einem Zeitraum durchgeführt, in dem routinemäßig Glukokortikoide zur Induktion der Lungenreifung bei drohenden Frühgeburten verabreicht werden (Committee on Obstetric 2002). Die fetale Asphyxie wurde durch eine viermalige, vierminütige vollständige Nabelschnurokklusion erreicht, um ein Abknicken der Nabelschnur, eine besonders unter der Geburt auftretende geburtshilfliche Komplikation, nachzuempfinden.

## **4. Material und Methode**

### **4.1. Experimentelles Protokoll**

#### **4.1.1. Allgemeine Vorbemerkungen**

Die Experimente wurden am Institut für Versuchstierkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Deutschland und im Department of Biomedical Sciences, Laboratory for Pregnancy and Newborn Research, Cornell University, Ithaca, New York, USA, durchgeführt, nachdem sie zuvor durch die Tierschutzkommission des Landes Thüringen und das „Cornell University Animal Use and Care Committee“ genehmigt worden waren.

Für die chirurgische Instrumentierung wurden drei sterile und ein unsteriler Mitarbeiter, sowie eine Person für die Anästhesie und zur Durchführung der Experimente zwei Mitarbeiter benötigt. Neben der Datenanalyse nahm ich an der chirurgischen Instrumentierung, der Durchführung der Experimente und den darauffolgenden Sektionen bei den in Deutschland durchgeführten Untersuchungen teil und war außerdem für die Präparation der Gehirne sowie die Aufarbeitung und Messung aller Proben verantwortlich.

#### **4.1.2. Chirurgische Instrumentierung der Feten**

Die Schafe gehörten der Rasse Rambouillet-Colombia bzw. deren europäischer Entsprechung Merino-Schwarzkopf an. Sie wurden nach ethischen Richtlinien im Freiland gehalten. Die Schafe wurden terminorientiert mittels Biotechnik verpaart und mindestens fünf Tage vor der unter sterilen Bedingungen bei exakt bekanntem Gestationsalter der Tiere durchgeführten Operation zur Akklimation in den Laborräumen untergebracht. Dabei wurde auf die strenge Einhaltung eines festen Hell-Dunkel-Rhythmus bei künstlichem Licht (14 Stunden Licht, Dunkelheit von 21 bis 7 Uhr), sowie auf den freien Zugang zu Futter und Wasser geachtet. Während des gesamten Aufenthaltes standen ein Tierarzt und mehrere Tierpfleger zur Verfügung, um eine adäquate Versorgung der Tiere zu gewährleisten.

Nach fünf Anpassungstagen erfolgte die chirurgische Instrumentierung der Feten. Alle Tiere erhielten nach 24 Stunden Nahrungskarenz als Prämedikation 0,04 mg/kg Körpergewicht Atropinsulfat i.m. (Braun, Melsungen, Deutschland).

Anschließend wurde eine Vollnarkose mit 1 g Ketamin i.m. (Ketamin 10, Atarost, Deutschland bzw. Ketaset, Fort Dodge Animal Health, IA, USA.) und 4% Halothan (Fluothane, Zeneca, Deutschland) eingeleitet und nach Intubation unter Beatmung mit 1,0-1,5% Halothan in 100% Sauerstoff aufrechterhalten.

Dem Mutterschaf wurde zur Blutprobengewinnung die linke A. carotis und zur postoperativen Antibiotikaprophylaxe und Verabreichung von Schmerzmedikamenten die linke V.jugularis katherisiert (Polyvinyl-Katheter, Tygon, Norton Performance Plastic, USA bzw. RüscheLit, Rüsche, Deutschland; 0,1 mm Innendurchmesser; 0,18 mm Außendurchmesser).

Der Fetus wurde nach abdominellem Median- und anschließendem Uterusschnitt freigelegt und mit vier Kathetern versehen. Ein Katheter wurde über die linke A.carotis communis in der Aorta ascendens platziert, um die arterielle Blutdruckmessung, die Entnahme von Blutproben und die Referenzblutentnahme im Rahmen der Mikrosphärentechnik zu gewährleisten. Außerdem wurde ein Katheter für die Betamethasongabe über die linke V. jugularis in die V. cava anterior (der humanen V. cava superior entsprechend) vorgeschoben, ein weiterer für die Mikrosphärenapplikation über die V. saphena magna in die V. cava posterior (der humanen V. cava inferior entsprechend) gelegt und schließlich ein Katheter in der Amnionhöhle platziert.

Zur Aufzeichnung von Uteruskontraktionen wurden Drahtelektroden in die Uterusmuskulatur eingenäht. Um die Ableitung des Elektrokortikogramms (ECoG) zur Bestimmung der Schlafstadien zu ermöglichen wurden nach Freilegung der Schädelkalotte Messingschraubchenelektroden biparietal und bifrontal implantiert und zusätzlich mit einem Kaltpolymerisat befestigt (Kallocryl, Laborchemie Apolda, Deutschland). Edelstahl Elektroden (LIFY, Metrofunk Kabel-Union Berlin, Deutschland) zur kontinuierlichen Ableitung des Elektrokardiogramms (EKG) zur Kontrolle der Vitalparameter wurden in der supraskapulären Muskulatur beider Schultern sowie im Knorpel des Sternums angebracht.

Diejenigen Tiere, bei denen eine Nabelschnurokklusion geplant war, erhielten einen sogenannten Vascular Occluder (In Vivo Metrics, Typ OC20HD), der an der proximalen Nabelschnur angebracht und an der Bauchwand fixiert wurde. Bei diesen Tieren wurden zusätzlich intrakortikale Lasersonden (400 µm Durchmesser, Moor, Devon, UK) angebracht, die auf einem Schädelknochen fixiert und ebenfalls mit Kaltpolymerisat (Kallocryl, Laborchemie Apolda,

Deutschland) gesichert wurden. Zwei Lasersonden wurden durch Bohrlöcher 0,05-0,08 cm in den rechten parietalen Kortex, zwei weitere 1,6-2,0 cm in den Subkortex vorgeschoben. Die Lasersonden dienten zur Messung der fetalen Hirndurchblutungsänderungen während der Asphyxie. Die Auswertung dieser Ergebnisse war aber nicht Bestandteil meiner Arbeit. Eine Übersicht über die angebrachten Elektroden und Katheter ist aus Tab.1 ersichtlich.

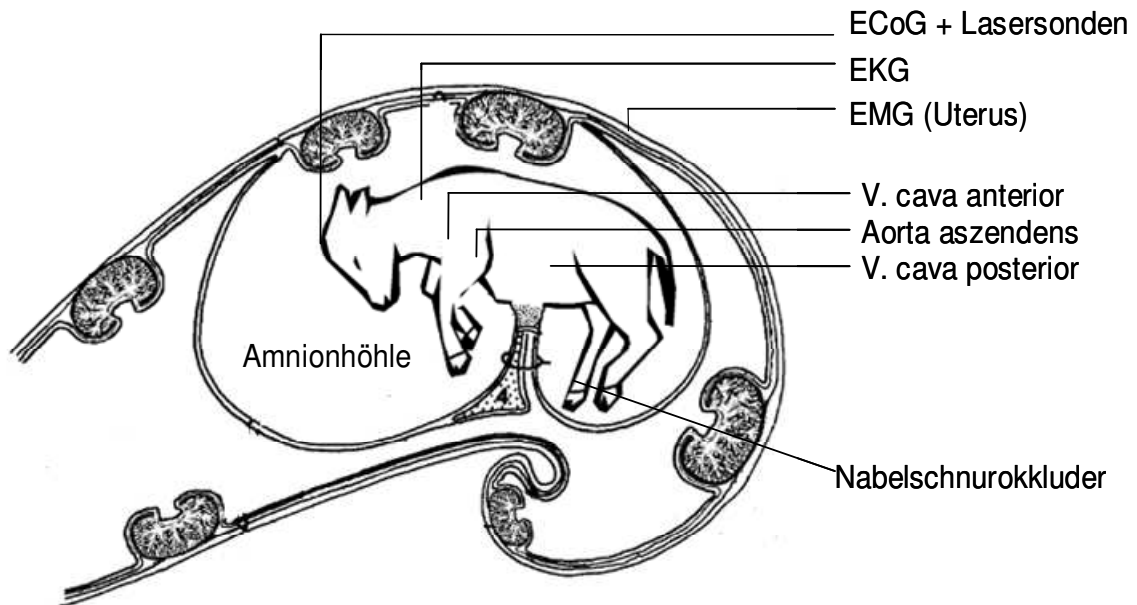
**Tabelle 1** Übersicht über die angebrachten Katheter und Elektroden zur Durchführung der Experimente am Tiermodell „chronisch instrumentierter Schaffetus“

<u>Ort der Katheter-/ Elektrodenlage</u>	<u>Grund der Platzierung</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aorta ascendens</li> <li>• Vena cava anterior</li> <li>• Vena cava posterior</li> <li>• Amnionhöhle</li> </ul>	Blutdruckmessung, Blutprobenentnahme, Referenzprobenentnahme zur Hirndurchblutungsmessung  Betamethasongabe  Mikrosphärenapplikation  Messung des hydrostatischen Druckes zur Blutdruckkorrektur
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Supraskapuläre Muskulatur (EKG)</li> <li>• Schädelkalotte (ECoG)</li> <li>• Uteruswand (EMG)</li> <li>• Intra- und subkortikale Lasersonden</li> </ul>	Aufzeichnung der Herzfunktion zur fetalen Überwachung  Aufzeichnung der Hirnaktivität  Aufzeichnung von Uteruskontraktionen  Messung der relativen Hirndurchblutungs- änderungen während der Asphyxie (nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit)

Der Fetus wurde wieder in den Bauch des Mutterschafes zurückgelegt und alle Katheter und Elektrodenkabel durch eine Inzision in der Flanke des Mutterschafes nach außen geleitet. Zum Schluss wurden Uterus und mütterliches Abdomen verschlossen. Alle Katheter wurden unmittelbar nach der Operation an Infusionspumpen angeschlossen und während des gesamten Versuchszeitraumes mit heparinisierter 0,9% Kochsalzlösung (15 IU Heparin/ml) bei einer Infusionsrate von 0,5 ml/h gespült.

Postoperativ wurde das Mutterschaf für drei Tage zweimal täglich mit Phenylbutazon oral (Equiphene paste, Luitpold Pharmaceuticals, Shirley, NY, USA) oder Metamizol i.v. (Arthropur, Atarost, Deutschland) analgesiert. Als

Antibiotikaphylaxe erhielt das Mutterschaf präoperativ 1 g Ampicillin (Ampicillin, Ratiopharm, Deutschland bzw. AMP-Equine; SmithKline Beecham, West Chester, PA, USA) i.m. und postoperativ für drei Tage zweimal täglich jeweils 0,5 g Ampicillin i.v. und in die Amnionhöhle. Abb.1 zeigt den chronisch instrumentierten Schaffetus in utero.



**Abbildung 1** Der instrumentierte Schaffetus in utero mit Kathetern in der Amnionhöhle, der V. cava anterior, der Aorta ascendens und der V. cava posterior, sowie ECoG-Elektroden auf der Schädelkalotte, EMG-Elektroden in der Uteruswand und EKG-Elektroden in der supraskapulären Muskulatur; bei Tieren, die einer Nabelschnurokklusion unterzogen wurden, wurde ein Nabelschnurokkluder sowie Lasersonden angebracht; modifiziert nach Rüsse und Sinowatz 1991

#### 4.1.3. Gruppeneinteilung

Um den vier Aufgabenstellungen gerecht werden zu können, wurden die Tiere unterschiedlichen Gruppen zugeordnet.

##### Hypothesen 1 und 2

Untersuchung der Wirkung einer pränatalen mütterlichen Glukokortikoidgabe auf die fetale Hirndurchblutung bei unterschiedlichen Gestationsaltern

- Messung der Hirndurchblutung zum Zeitpunkt 0,73 der Gestation (110.-112.Tag)
- Messung der Hirndurchblutung zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation (128.-130.Tag)

### Hypothese 3

Untersuchung der Glukokortikoideffekte auf die fetale Hirndurchblutung unter Beachtung der Schlafstadien (REM- und NREM-Schlaf)

- Messung der Hirndurchblutung zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation (128./129.Tag)

Die Glukokortikoidbehandlung erfolgte in diesen 3 Gruppen mittels zweimaliger intramuskulärer maternaler Betamethasoninjektion.

### Hypothese 4

Untersuchung der Wirkung von Glukokortikoiden auf die zerebrale Reperfusion nach einer Asphyxie (repetitive komplette Nabelschnurokklusion am 127.Gestationstag)

- Messung der Hirndurchblutung unter asphyktischen Bedingungen zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation (127./128.Tag)

Die Glukokortikoidbehandlung erfolgte in dieser Gruppe mittels kontinuierlicher fetaler Betamethasoninfusion über 48h.

Die Tiere wurden randomisiert entweder der Plazebogruppe oder der Wirkstoffgruppe zugeteilt. Die genauen Stichprobenzahlen sind aus Tab.2 ersichtlich, eine Übersicht über die Versuchsgruppen zeigt Tab.3. Die Rahmenbedingungen (Vorbereitungsphase, chirurgische Instrumentierung, Monitoring, Sektion) waren bei allen Gruppen gleich.

**Tabelle 2** Stichprobenzahlen in den einzelnen Versuchsgruppen mit Angabe des Gestationszeitpunktes zur Messung der fetalen Hirndurchblutung (CBF)

	Normoxische Bedingungen			Asphyktische Bedingungen
			Schlafstadienabhängigkeit	
Gestationszeitpunkt zur CBF-Messung	0,73	0,85	0,85	0,85
Kontrolltiere	6	7	7	9
Betamethasontiere	7	6	10	10
Gesamtzahl	13	13	17	19



**Tabelle 3** Experimentelles Protokoll mit Übersicht über die einzelnen Versuchsgruppen zur Messung der fetalen Hirndurchblutung (CBF) mittels fluoreszierender Mikrosphären (FMS) unter normoxischen Bedingungen, in Abhängigkeit von den Schlafstadien und nach einer Asphyxie durch Nabelschnurokklusion (UCO) unter Angabe der mittleren Gestationstage (ohne SEM).

<b>CBF unter normoxischen Bedingungen nach maternaler Injektion</b>	<b>CBF in Abhängigkeit von REM- und NREM-Schlaf nach maternaler Injektion</b>	<b>CBF unter hypoxischen Bedingungen nach fetaler Infusion</b>
<b>VORBEREITUNGSPHASE</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Behandlung gegen Endo- und Ektoparasiten, Klauenpflege der Tiere</li> <li>• Termingerechte Verpaarung mittels Biotechnik</li> <li>• Abholung vom Schäfer, Unterbringung in den Versuchsräumen</li> <li>• Mehrtägige Akklimatisation in den Versuchsräumen</li> </ul>		
<b>EXPERIMENTALPHASE</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Chirurgische Instrumentierung mit Platzierung der Katheter und Anbringen des ECoGs</li> </ul>		
<b>104. bzw. 123.Tag</b>	<b>121.Tag</b>	<b>121.Tag</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antibiotikaprophylaxe</li> <li>• Erholungsphase für Mutter und Fetus über mindestens 5 Tage</li> <li>• Start der kontinuierlichen Überwachung von Blutdruck, Amniondruck, EKG, ECoG und Uterusaktivität</li> <li>• Erste Mikrosphäreninjektion unter Normalbedingungen</li> </ul>		
<b>110. bzw. 128.Tag</b>	<b>127.Tag</b>	<b>125.Tag</b>
1. intramuskuläre Betamethasoninjektion (110. bzw. 128.Tag)  2. und 3. FMS-Injektion (nach 4h und 24h)  2. intramuskuläre Betamethasoninjektion (112. bzw. 130.Tag)  4. und 5. FMS-Injektion (nach 4h und 24h)	Erste intramuskuläre Betamethasoninjektion (127.Tag)  2. und 3. FMS-Injektion (im REM und NREM Schlaf nach 24h)  2. intramuskuläre Betamethasoninjektion (128.Tag)  4. und 5. FMS-Injektion (im REM und NREM Schlaf nach 4h)	Beginn der Betamethasoninfusion über 48h (126.Tag)  2. FMS-Injektion (nach 2h)  Durchführung von 4 4minütigen UCOs am 127.Tag  3. FMS-Injektion direkt im Anschluss  4. und 5. FMS-Injektion (nach 2 und 24h)
<b>SEKTION</b>		
<b>113. bzw. 131.Tag</b>	<b>129.Tag</b>	<b>129.Tag</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Perfusionsfixierung des Gehirnes mittels Formaldehyd</li> <li>• Entnahme der Gehirne und Zerteilung in 12 einzelne Hirnregionen</li> <li>• Aufarbeitung der Proben mit anschließender Messung der Fluoreszenz</li> </ul>		

#### **4.1.4. Versuchsablauf**

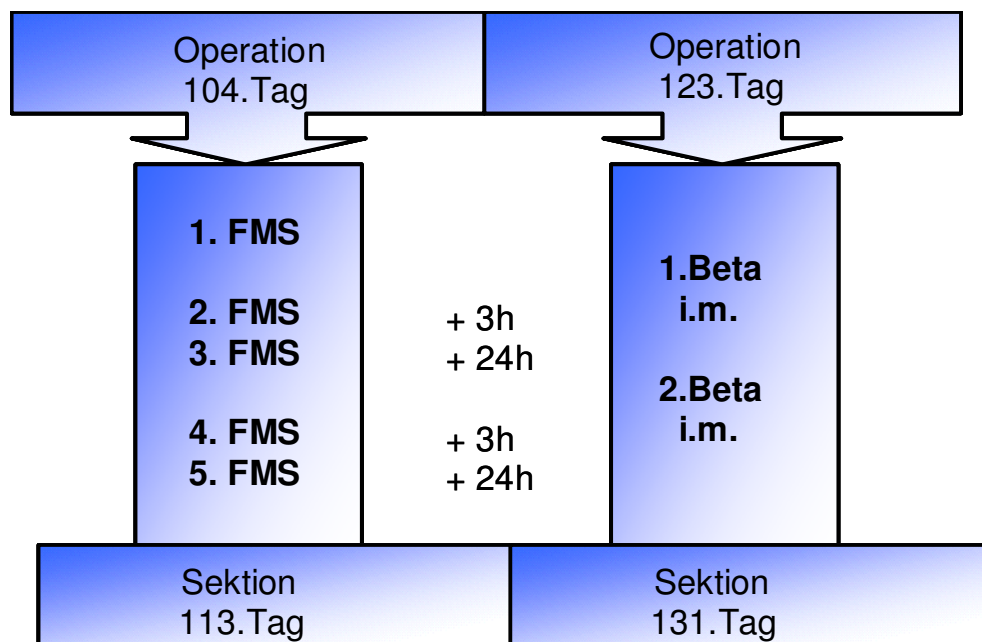
Nach der chirurgischen Instrumentierung wurden Mutter und Fetus weitere fünf Tage überwacht. Diese Erholungsphase diente der Stressreduktion, da die Ausschüttung von Glukokortikoiden nicht nur einem zirkadianen Rhythmus folgt, sondern auch stressabhängig schwankt. Bei allen operierten Tieren wurden täglich sowohl fetale als auch mütterliche Blutgasuntersuchungen und pH-Bestimmungen (Blood Gas Analyzer ABL715, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) durchgeführt. Die Sauerstoffsättigung wurde photometrisch (Hemoximeter OSM2, Radiometer) bestimmt. Um zirkadian bedingte Fehler auszuschließen, denen die endogene Glukokortikoidproduktion unterliegt, wurden die Experimente jeweils um 9 Uhr morgens begonnen. Mit Beginn des ersten Tages postoperativ begann ein kontinuierliches Monitoring (Herzfrequenz, arterieller Blutdruck, Amniondruck, EKG, ECoG und Uterusaktivität).

#### **Fetale Hirndurchblutungsmessung unter normoxischen Bedingungen zum Zeitpunkt 0,73 und 0,85 der Gestation**

In beiden Gruppen befanden sich jeweils 13 trächtige Muttertiere. Die erste Mikrosphärenapplikation zur Messung der Hirndurchblutung unter Normalbedingungen wurde am  $110 \pm 1$ . bzw.  $128 \pm 1$ . Trächtigkeitstag durchgeführt. Die Glukokortikoidbehandlung bestand aus zwei im Abstand von 24 Stunden folgenden maternalen intramuskulären Injektionen von Betamethasonphosphat (Celestan Solubile, Essex, München) in einer Dosis von  $110 \mu\text{g}$  bzw.  $170 \mu\text{g}$  pro kg Körpergewicht. Dies entspricht 8 oder 12 mg bei einer 70kg schweren Schwangeren, eine in der klinischen Praxis übliche Applikation. Zum Zeitpunkt 0,73 der Gestation wurden 8 mg Betamethason gewählt, da sich in Vorversuchen zeigte, dass die Tiere nach der Gabe von 12 mg in die Frühgeburtsphase kamen. Glukokortikoide können beim Wiederkäuer durch Induktion einer frühzeitigen Wehentätigkeit zum Abort führen. Den Kontrolltieren wurde physiologische NaCl-Lösung injiziert.

Da nach maternaler Gabe die höchste Konzentration von Betamethason im Blut nach 2 bis 4 Stunden erreicht ist (Schwab et al. 2006, in Druck), wurden weitere Mikrosphären jeweils nach 3 Stunden und schließlich mit einer Latenzzeit von 24 Stunden nach den Injektionen verabreicht. Alle

Hirndurchblutungsmessungen wurden im REM-Schlaf durchgeführt um die schlafstadienabhängigen Schwankungen der Hirndurchblutung (5.2.) und damit auftretende Verfälschungen der Ergebnisse auszuschließen. Wenn Uteruskontraktionen auftraten wurde die Hirndurchblutung nicht gemessen, da Uteruskontraktionen mit Blutdruck- und Herzfrequenzänderungen, einem Abfall des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes sowie mit Änderungen in der elektrokortikalen Aktivität bis hin zu Schlafstadienänderungen einhergehen können (Shinozuka und Nathanielsz, 1998). Die Gehirne wurden direkt nach Abschluss der Experimente am  $113 \pm 1$  bzw.  $131 \pm 1$  Trächtigkeitstag gewonnen (Abb. 2).

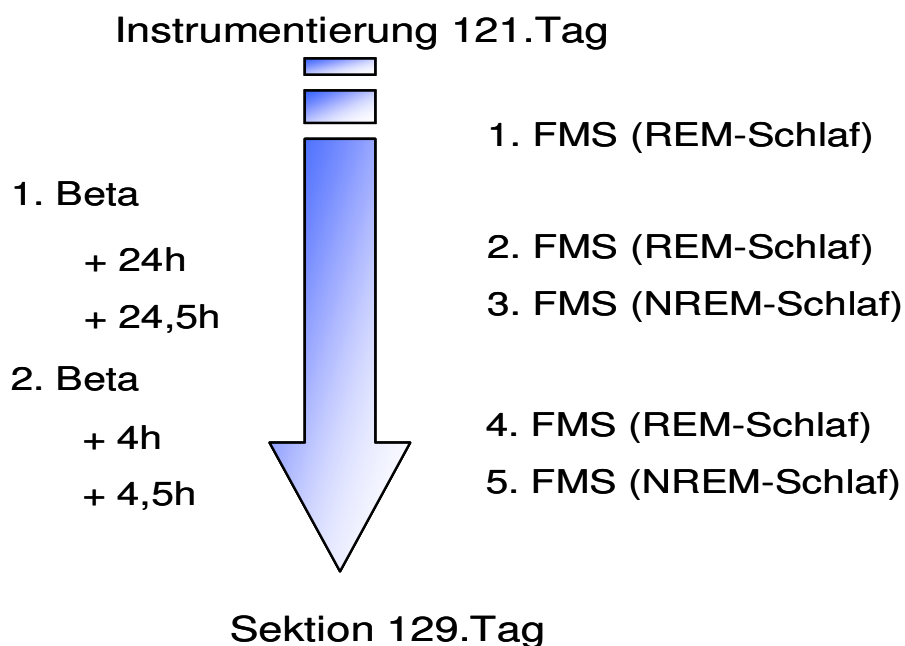


**Abbildung 2** Übersicht des experimentellen Protokolls zur Hirndurchblutungsmessung mittels fluoreszierender Mikrosphären (FMS) zum Zeitpunkt 0,73 und 0,85 der Gestation nach zweimaliger intramuskulärer Betamethasoninjektion (Beta i.m.)

### **Fetale Hirndurchblutungsmessung zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation in Abhängigkeit von den Schlafstadien**

Dafür wurden 17 Schaffeten chronisch instrumentiert. Die erste Mikrosphärenapplikation erfolgte unter Normalbedingungen, vor jeglicher Medikamentengabe. Während der ersten Messung wurde elektroenzephalographisch ein REM-Stadium der Feten ermittelt. Im Anschluss daran wurde dem Muttertier zum ersten Mal eine Dosis Betamethasonphosphat von  $170\mu\text{g}$  pro kg Körpergewicht, entsprechend 12 mg beim Menschen,

intramuskulär appliziert. In der Kontrollgruppe wurde NaCl injiziert. Nach 24 Stunden folgten dann zwei weitere Mikrosphärengaben im Abstand von einer halben Stunde. Dabei wurden darauf geachtet, dass eine Gabe im REM-Schlaf und die andere im NREM-Schlaf erfolgte. Unmittelbar danach wurde zum zweiten Mal eine Dosis Betamethasonphosphat verabreicht. 4 Stunden später wurden zum letzten Mal Mikrosphären appliziert, wiederum einmal im REM- und einmal im NREM-Schlaf, im Abstand von einer halben Stunde. Abb. 3 zeigt eine Übersicht.

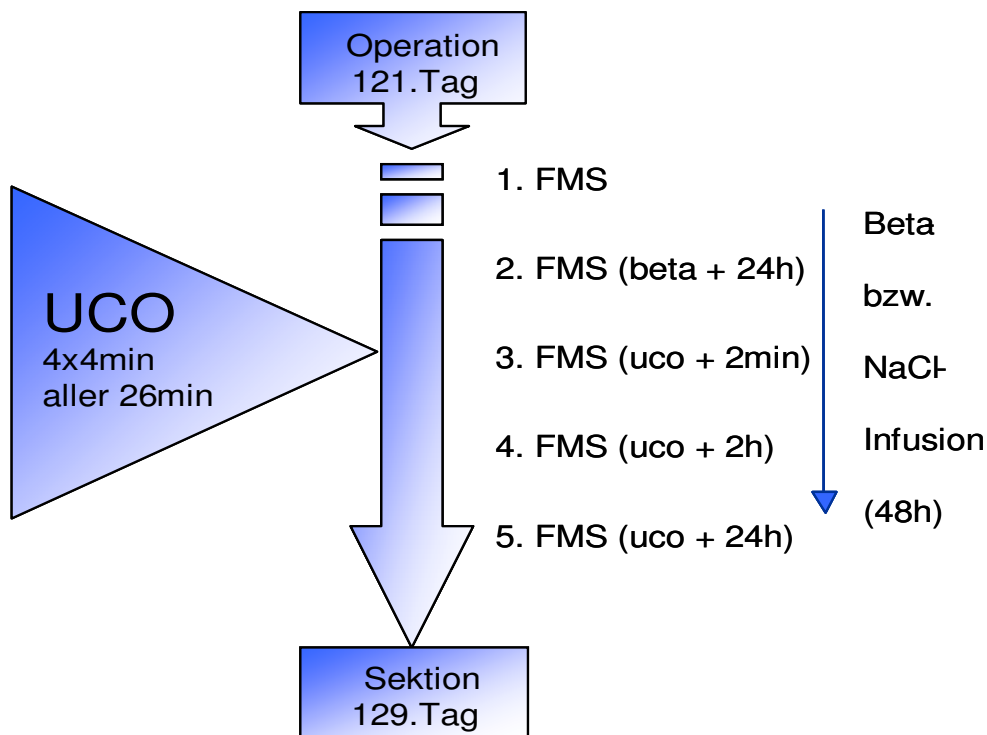


**Abbildung 3** Übersicht des experimentellen Protokolls zur Hirndurchblutungsmessung mittels fluoreszierender Mikrosphären (FMS) zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation nach zweimaliger intramuskulärer Betamethasoninjektion in Abhängigkeit von den Schlafstadien

### **Fetale Hirndurchblutungsmessung zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation vor und nach einer Asphyxie mittels Nabelschnurokklusion (UCO)**

19 Schafe wurden chronisch instrumentiert. Am  $126 \pm 1$ . Trächtigkeitstag wurde dann mit der Infusion von isotonischer Kochsalzlösung als Kontrolle oder Betamethasonphosphat mit einer Rate von  $3,3 \mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$  in die fetale V. jugularis begonnen. Dies wurde über 48 Stunden aufrechterhalten. Am darauffolgenden Tag wurde an der fetalen Nabelschnur eine 4-malige 4-minütige totale Okklusion der Nabelschnur in einem Zeitraum von 2 Stunden durchgeführt. Dazu wurde ein Nabelschnurokkluder mit 15 - 18 ml Luft gefüllt und mit einer Klemme geblockt, wodurch die Nabelschnurgefäße komprimiert

wurden. Zwischen den einzelnen Okklusionen lagen Pausen von jeweils 26 Minuten. Hirndurchblutungsmessungen erfolgten zum einen unter Normalbedingungen vor Beginn der eigentlichen Experimente, 24 Stunden nach Beginn der Glukokortikoidinfusion, direkt nach der Nabelschnurokklusion, sowie 2 und 24 Stunden nach der Asphyxie. Während der Asphyxie wurden Hirndurchblutungsmessungen mittels Mikrosphären vermieden, um den Fetus nicht zusätzlich durch die Referenzblutprobenentnahme zu gefährden. Vorversuche haben gezeigt, dass eine auch nur geringe Verstärkung der Asphyxie zum letalen Ausgang führen kann. Deshalb wurden die relativen Hirndurchblutungsänderungen mittels Laser Doppler Flowmetry gemessen. Dies war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Die Sektion erfolgte am 129. Trächtigkeitstag (Abb.4).



**Abbildung 4** Übersicht des experimentellen Protokolls zur Hirndurchblutungsmessung mittels fluoreszierender Mikrosphären (FMS) zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation unter den Bedingungen einer Asphyxie, die durch Nabelschnurokklusionen (UCOs) hervorgerufen wurden

### Gewinnung der Gehirne

Der Fetus wurde durch einen Bauch- und Uterusschnitt entnommen und durch Exsanguination getötet. Das fetale Gehirn wurde über einen Zugang in der A. carotis communis mit heparinisierter 0,9%iger Kochsalzlösung blutleer gespült

und mit 2%iger Formaldehydlösung perfusionsfixiert. Danach wurde nach Überprüfung der korrekten Katheterlage sowohl das fetale Körpergewicht und das Gewicht von Gehirn, Herz und Leber gemessen sowie die Probenentnahme durchgeführt. Später erfolgte dann die Präparation des Gehirns, wobei eine Hemisphäre histologisch untersucht wurde und die andere für die Hirndurchblutungsmessung zur Verfügung stand. Die Muttertiere wurden mittels intravenöser Pentobarbitalgabe (Fatal-Plus, Vortech Pharmaceuticals, Dearborn, MI, USA oder Narcoren, Aventis, Deutschland) getötet.

## **4.2. Datenerfassung und Messung der Zielparameter**

### **4.2.1. Erfassung elektrophysiologischer Parameter**

Das ECoG wurde bipolar abgeleitet. Darüber hinaus wurden Blutdruck, Amniondruck, Elektrokardiogramm und Elektromyogramm kontinuierlich aufgezeichnet. Die abgeleiteten physiologischen Signale wurden mittels eines Physiographen (Gould Instruments, Valley View, OH, USA) verstärkt, gefiltert (Bandbreiten für Uterus-EMG 1-10 Hz, für ECoG 0,3-30 Hz) und anschließend über einen 16-Kanal A/D Wandler (DT2801F, Data Translation, Marlborough, MA, USA) mit einer Abtastfrequenz von  $128 \text{ sec}^{-1}$  (ECoG und EKG) bzw.  $32 \text{ sec}^{-1}$  (EMG) digitalisiert. Die Daten wurden kontinuierlich auf einem PC aufgezeichnet.

### **4.2.2. Blutgasbestimmung**

Die Blutparameter ( $p_{\text{aO}_2}$ ,  $p_{\text{aCO}_2}$ , pH) des Fetus und der Mutter wurden mindestens einmal täglich, während der Experimente jedoch mehrmals kontrolliert. Dazu wurde etwa 2ml arterielles Blut entnommen und mit Hilfe eines Blutgasanalysators (ABL600, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) bestimmt. Um die zum Zeitpunkt der Mikrosphärenapplikation herrschenden Verhältnisse am besten wiedergeben zu können, wurden die unmittelbar vor und nach der Applikation gemessenen Werte gemittelt.

In der Gruppe, bei der eine Nabelschnurokklusion durchgeführt wurde, wurden zusätzlich Glukose und Laktatwerte im fetalen Blut ermittelt. Zur kontinuierlichen Überwachung und gegebenenfalls Intervention wurde jeweils 5

Minuten vor und 3 Minuten nach jeder Nabelschnurokklusion Blutparameter bestimmt.

#### 4.2.3. Hirndurchblutungsmessung

Mikrosphären werden seit fast 40 Jahren eingesetzt um die Durchblutung verschiedenster Organe zu messen (Rudolph und Heymann 1967).

Die hier eingesetzten fluoreszierenden Mikrosphären bestanden aus Polystyren und hatten einen Durchmesser von 10 µm (FluoSpheres®, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Dabei kamen 5 der von der Firma angebotenen 7 Farben (blau, blaugrün, gelbgrün, orange und crimson) zum Einsatz, so dass es möglich wurde die regionale Hirndurchblutung quantitativ zu maximal 5 Zeitpunkten zu messen, ohne dass aufwendige Verrechnungen von Spektrenüberlagerungen durchgeführt werden mussten.

Normalerweise gelangen die Mikrosphären von der Vena cava posterior aus ins Herz und über das offene Foramen ovale in den linken Vorhof und linken Ventrikel, um schließlich auf alle Organe verteilt zu werden. Da in der Aorta ascendens ein konstanter Blutfluss, herrscht konnte so die regionale Durchblutung der einzelnen Organe bestimmt werden, indem das Verhältnis der in der Referenzblutprobe und in den Organen gefundenen Mikrosphärenzahl gebildet wurde:

$$\text{Durchblutung}_{\text{Gewebe}} = \frac{\text{Mikrosphärenzahl}_{\text{Gewebe}} \times \text{Referenzfluss}}{\text{Mikrosphärenzahl}_{\text{Referenz}}}$$

Um einheitliche Ausgangsbedingungen zu garantieren wurden der pH-Wert und die Blutgase vor jeder Mikrosphärenapplikation gemessen und bei myographisch nachweisbarer Uterusaktivität abgewartet, bis diese vorbei war.

Die Mikrosphären wurden im Ultraschallbad auf Körpertemperatur erwärmt und anschließend mit Hilfe eines Laborschüttlers homogen in der Trägerflüssigkeit verteilt. Dadurch lagen sie zum Injektionszeitpunkt in einer relativen Dichte vor, die der des fetalen Blutes entsprach (1,05 g/ml). Über den in der Vena saphena magna platzierten Katheter erfolgte dann die Mikrosphäreninjektion in die Vena cava posterior (dies entspricht der humanen V. cava inferior). Dazu wurden ca. 1,5 Millionen Mikrosphären in eine sterile Spritze aufgezogen. Die Injektion der Mikrosphären in die fetale V. cava posterior garantiert einen nahezu

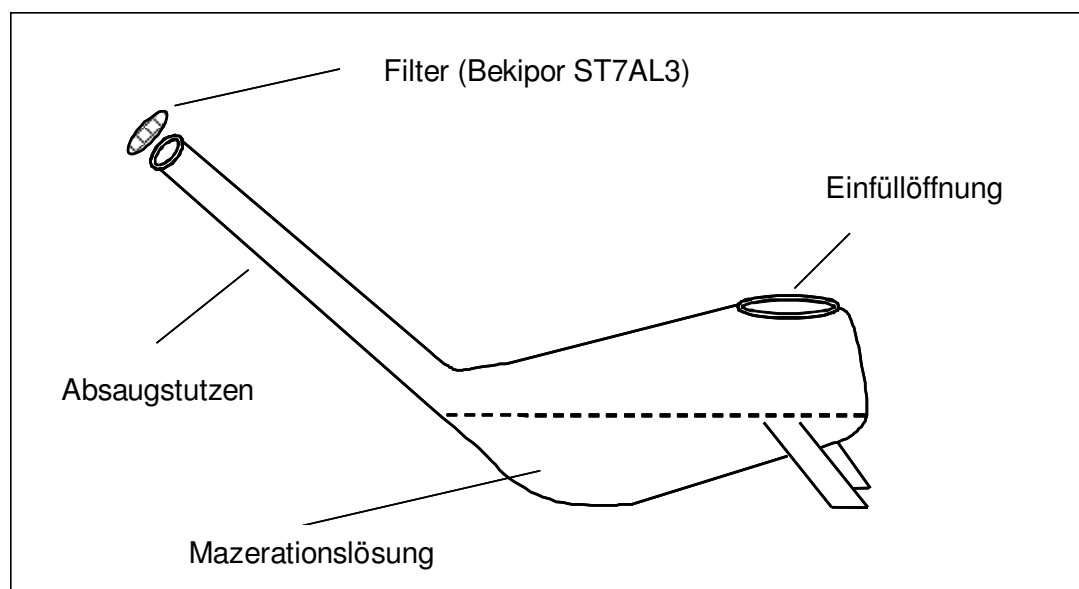
vollständigen Transport der Mikrosphären in den „oberen“ Kreislauf aufgrund der Besonderheiten des fetalen Kreislaufes.

Die Referenzblutprobe aus dem Katheter in der Aorta ascendens wurde mittels einer Infusionspumpe (sp200i, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) in eine zuvor heparinisierte 10-ml-Glasspritze (Model 1010 TLL w/slots, Gastight Syringes, Hamilton, Reno, NV, USA) aufgezogen. Die Pumpe wurde schon 20 bis 25 Sekunden vor der Mikrosphärenapplikation in Gang gesetzt, so dass bei einer Rate von 2 ml pro Minute ungefähr 6 ml Blut gewonnen wurden. Durch Verwendung der heparinisierten Glasspritze konnte zum einen das Anhaften von Mikrosphären an der Wandung und zum anderen das Gerinnen des Blutes in der Spritze vor der Umfüllung in das Mazerationsgefäß verhindert werden.

Nach Beendigung der Experimente und der Perfusionsfixierung des Gehirnes wurde die rechte Hemisphäre in 12 verschiedene Abschnitte zerteilt (Medulla oblongata, Zerebellum, Pons, Mesenzephalon, Hippokampus, Thalamus, Striatum, frontaler, medianer, parietookzipitaler, parietotemporaler und okzipitaler Kortex). Die linke Hemisphäre wurde histologisch aufgearbeitet. Die einzelnen Proben wurden in spezielle Mazerationsgefäße aus Glas gegeben und dort in 4N KOH und 1% Tween 80 (Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland) verdaut. Der Zusatz von Tween sollte das Anhaften von Probenstückchen an der Gefäßwand verhindern. Um den Verdauungsprozess zu optimieren wurden die Proben in einem Wärmeschrank auf 50°C erwärmt. Aufgrund der erhöhten Agglutinationsneigung wurde bei den Referenzblutproben darauf verzichtet. Die Mazerationsgefäße (Abb. 5) waren mit einem Metallfasersieb (Porengröße 7µm, Bekipor ST7AL3, Bekart Fibre Technologies, Belgien) versehen, das mit Hilfe von Silikonkautschuk (Elastosil E41, Wacker Chemie, München) am Hals des Gefäßes befestigt wurde. Über diesen Filter wurden die Proben mit einer Wasserstrahlpumpe abgezogen, indem sie mit dem Hals nach unten gekippt wurden. Anschließend wurde das Gefäß um eventuell anhaftende Mikrosphärenreste zu entfernen zweimal mit 80% Alkohol und zweimal mit Aqua destillata gespült. Die Glasgefäße wurden für 24 Stunden getrocknet. Dabei blieben sie in derselben Position, so dass der Hals immer nach unten zeigte. Nun konnte man mit dem Herauslösen des Farbstoffes aus den Mikrosphären beginnen, die sich an der Innenseite des Metallfasersiebs befanden. Dazu wurden 500 µl o-Xylol (Sigma-Aldrich



Chemicals, Deisenhofen, Deutschland) auf den Filter pipettiert. Die Extraktionsflüssigkeit wurde in Glasküvetten (Innendurchmesser 1,0 cm, Abbott Laboratories, NC, USA) aufgefangen, die auf den Hals, und damit auf den Filter, gesteckt wurden. Nach 60 Minuten wurden 400 µl davon abpipettiert und bis zur Messung bei  $-19^{\circ}\text{C}$  gelagert.



**Abbildung 5** Mazerationsgefäß zur Aufarbeitung der fluoreszierenden Mikrosphären (nach Matthias Löhle)

Die Messung erfolgte an einem Fluoreszenzspektrophotometer (LS 50B Luminescence Spectrometer, Perkin Elmer Instruments, Shelton, CT, USA) mit Hilfe spezieller Software (FL WinLab Version No.2.01, Perkin Elmer Instruments, Shelton, CT, USA).

150 µl der Extraktionsflüssigkeit wurden in Quarzküvetten (Ultra-Mikro-Küvetten, Suprasil QS 105.200, Hellma, Müllheim, Deutschland) pipettiert und die Emissionsspektren für alle Farben bestimmt. Bei konstanten Wellenlängen konnte man nun die entsprechenden Intensitäten aus diesen Spektren ablesen (Tab.4).

**Tabelle 4** Übersicht über die Wellenlängen der einzelnen Mikrosphärenfarben

Sphärenfarbe	blau	blaugrün	grüngelb	orange	crimson
Wellenlänge	393 nm	452 nm	512 nm	559,5 nm	641 nm

Die vom Hersteller angegebene lineare Korrelation zwischen Fluoreszenzintensität und Sphärenzahl wurde für einen Bereich bis mindestens 500 Intensitätseinheiten bereits bewiesen (Emig 1996). Alle Proben, die höhere Emissionswerte zeigten, wurden daher stufenweise verdünnt, um einer etwaigen Eigenhemmung der Fluoreszenz zuvorzukommen. Die spezifische Organdurchblutung konnte bei einer linearen Korrelation zwischen Fluoreszenzintensität und Mikrosphärenzahl unter Ergänzung des Probengewichtes folgendermaßen berechnet werden:

$$\text{Durchblutung} = \frac{\text{Intensität}_{\text{Gewebe}} \times \text{Referenzfluss [ml/min]} \times 100 \times \text{Vf}_{\text{Gewebe}}}{\text{Intensität}_{\text{Referenz}} \times \text{Probengewicht [g]} \times \text{Vf}_{\text{Referenz}}} \times \frac{\text{ml}}{\text{min} \times 100\text{g}}$$

*Vf – Verdünnungsfaktor*

Nun standen die absoluten Hirndurchblutungswerte für fünf kortikale Regionen, sowie für die subkortikalen Regionen Thalamus und Striatum, den Hippokampus, den Hirnstamm (Medulla, Pons) sowie das Kleinhirn zur Verfügung.

#### 4.2.4. Analyse des Elektrokortikogramms

Die Bestimmung der fetalen Schlafstadien erfolgte visuell am Monitor vor der Mikrosphärenapplikation anhand des Elektrokortikogramms (Windaq 32, Dataq Instr., Akron, Ohio, USA). Die Injektion der Mikrosphären in den korrekten Schlafstadien wurde im Anschluss an die Versuche mittels Spektralanalyse des ECoG (Watisa, Uni Jena) verifiziert.

#### 4.2.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels ein- und zweifaktorieller Varianzanalyse im Computerprogramm SPSS, sowie mit Hilfe des T-Tests für unabhängige Stichproben. Danach wurde mit Hilfe der Signifikanzschranken für das von Holm und Shaffer (1986) modifizierte Holm-Verfahren eine Alphaadjustierung durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (MW  $\pm$  SEM) dargestellt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant betrachtet.

## 5. Ergebnisse

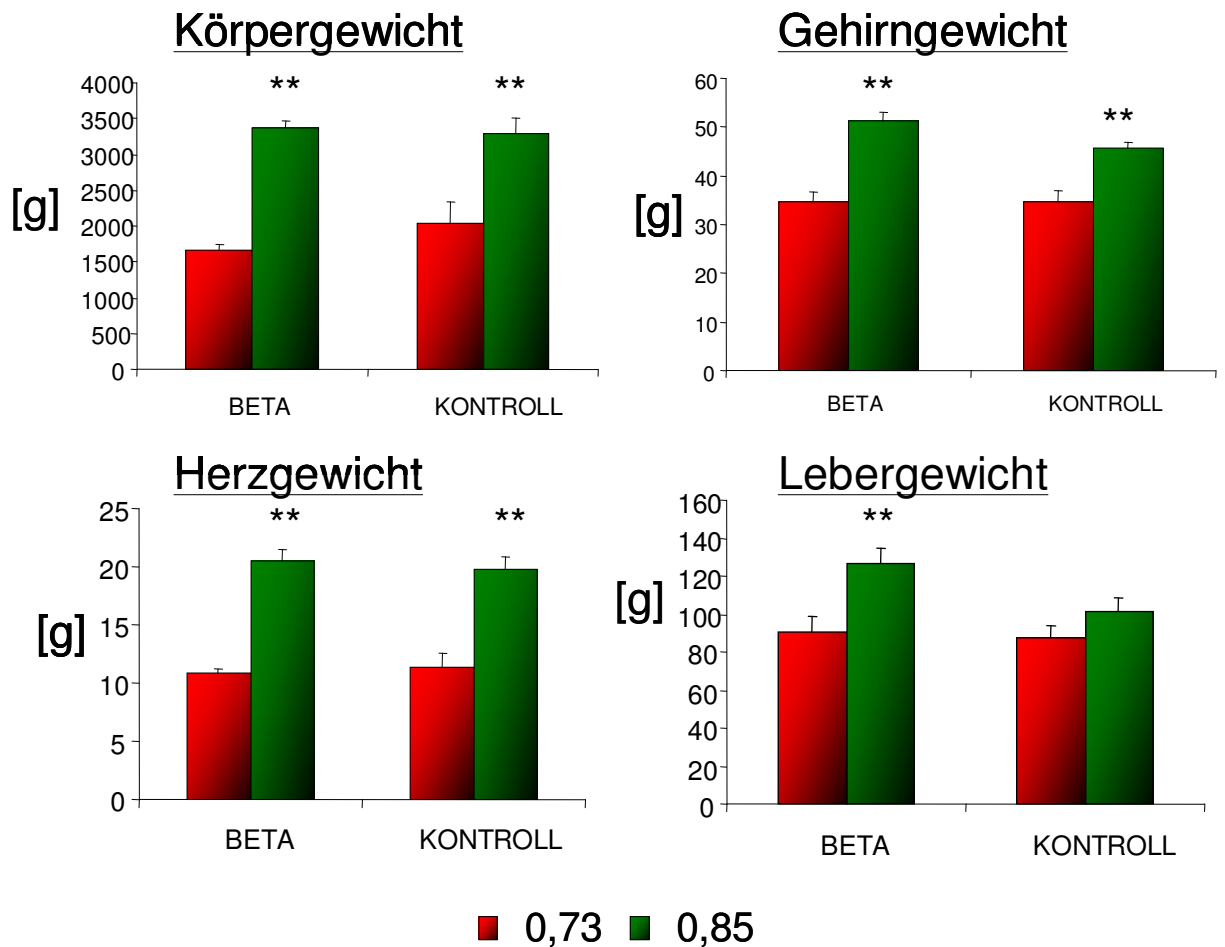
### 5.1. Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die fetale Hirndurchblutung bei unterschiedlichen Gestationsaltern

#### 5.1.1. Die fetale Hirndurchblutung bei unterschiedlichen Gestationsaltern

##### 5.1.1.1. Physiologische Variablen und Wachstum

Hinsichtlich des pH-Wertes und der arteriellen Blutgase fanden sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen zum Zeitpunkt 0,73 und 0,85 der Gestation (Tab.5 und 6). Das Körpergewicht war bei den älteren Tieren um  $74 \pm 18\%$  in der Kontrollgruppe ( $p \leq 0,01$ ) und um  $104 \pm 12\%$  in der Betamethasongruppe ( $p \leq 0,01$ ) höher gegenüber den jüngeren Tieren. Das Gehirngewicht war in der Kontrollgruppe um  $43 \pm 10\%$  ( $p \leq 0,01$ ), in der behandelten Gruppe um  $44 \pm 3\%$  ( $p \leq 0,01$ ) höher. Auch das Herzgewicht ( $88 \pm 19\%$  in der Kontrollgruppe ( $p \leq 0,01$ ),  $82 \pm 11\%$  in der Betamethasongruppe,  $p \leq 0,01$ ) war im Vergleich zu den jüngeren Tieren höher, während in Bezug auf das Lebergewicht nur in der Betamethasongruppe ein schwereres Gewicht nachweisbar war ( $43 \pm 19\%$ ,  $p \leq 0,01$ ), jedoch fand sich auch in der Kontrollgruppe eine Wachstumstendenz. Die Gewichte in den einzelnen Gruppen sind noch einmal in Abb.6 verdeutlicht.

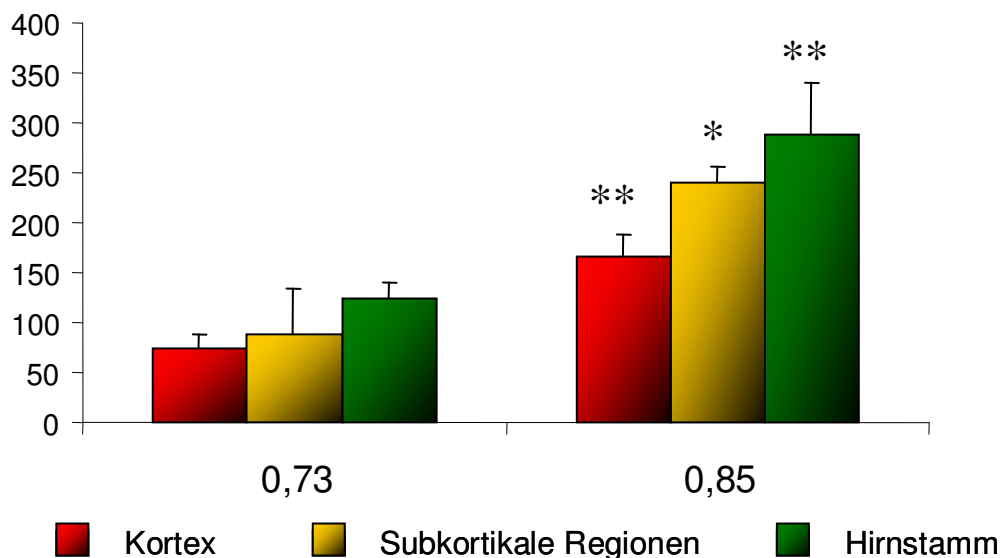
Es lag weder zum Zeitpunkt 0,73 noch zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation eine Wachstumsretardierung vor. Bezieht man die einzelnen Gewichte von Leber, Herz und das Gesamtkörpergewicht jeweils auf das Gehirngewicht, finden sich keine Unterschiede zwischen älteren und jüngeren Tieren, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch kein asymmetrisches Wachstum stattgefunden hat.



**Abbildung 6** Körpergewicht und Gewicht von Herz, Gehirn und Leber zum Zeitpunkt 0,73 und 0,85 der Gestation, MW  $\pm$  SEM, n=6 (Kontrollgruppe) bzw. n=7 (Betamethasongruppe) am 110.Tag, n=7 (Kontrollgruppe) bzw. n=6 (Betamethasongruppe) am 128.Tag, \*\*p $\leq$ 0,01 im Vergleich zum Zeitpunkt 0,73 der Gestation

### 5.1.1.2. Vergleich der fetalen Hirndurchblutung zum Zeitpunkt 0,73 und 0,85 der Gestation

Zum Zeitpunkt 0,73 der Gestation ( $p \leq 0,05$ ) und zum Zeitpunkt 0,85 ( $p \leq 0,01$ ) zeigte sich in den untersuchten Hirnregionen die für das adulte Gehirn typische Verteilung der Hirndurchblutung mit der höchsten Durchblutung im Hirnstamm und der niedrigsten in den kortikalen Regionalen. Vergleicht man die einzelnen Hirnregionen, so findet man im Hirnstamm eine um  $135 \pm 18\%$  ( $p \leq 0,01$ ) höhere Durchblutung zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation. Die Durchblutung in den subkortikalen Regionen war bei den älteren Tieren um  $172 \pm 1\%$  ( $p \leq 0,05$ ), im Kortex um  $121 \pm 15\%$  ( $p \leq 0,01$ ) höher im Vergleich zu den jüngeren Tieren (Abb.7).



**Abbildung 7** Hirndurchblutung zum Zeitpunkt 0,73 und 0,85 der Gestation im Hirnstamm, in den subkortikalen Regionen und im Kortex (MW  $\pm$  SEM aus Kontroll- und Betamethason- gruppe vor Beginn der Medikamentengabe),  $n=13$  in beiden Gruppen, \*\* $p \leq 0,01$  bzw. \* $p \leq 0,05$  im Vergleich zum Zeitpunkt 0,73 der Gestation. Unterschiede zwischen den Regionen aus Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

### 5.1.2. Glukokortikoideffekte auf die fetale Hirndurchblutung zum Zeitpunkt 0,73 der Gestation

#### 5.1.2.1. Physiologische Variablen

Alle Tiere befanden sich während des Beobachtungszeitraumes in einem guten Allgemeinzustand. Zur Hirndurchblutungsmessung betrug das Trächtigkeitsalter in der Kontrollgruppe  $111 \pm 0$  Tage, in der Betamethasongruppe  $110 \pm 1$  Tage. Die Kontrolltiere wogen zur Sektion  $2,0 \pm 0,3$  kg, die mit Betamethason behandelten Tiere  $1,7 \pm 0,1$  kg. Die beiden Gruppen unterschieden sich damit nicht. Auch hinsichtlich des Gehirngewichtes fanden sich keine Veränderungen in beiden Gruppen (Kontrollgruppe  $20,4 \pm 1,1$ g, Betamethasongruppe  $19,8 \pm 1,0$ g).

Der pH-Wert und die arteriellen Blutgase im fetalen Blut blieben während der Experimente konstant (Tab.5)

**Tabelle 5** Übersicht über pH-Wert und arteriellen Kohlendioxid- und Sauerstoffpartialdruck im fetalen Blut vor, sowie jeweils 3h und 24h nach einer intramuskulären NaCl- oder Betamethasoninjektion ( $110\mu\text{g/kg}$  Körpergewicht) zum Zeitpunkt 0,73 der Gestation

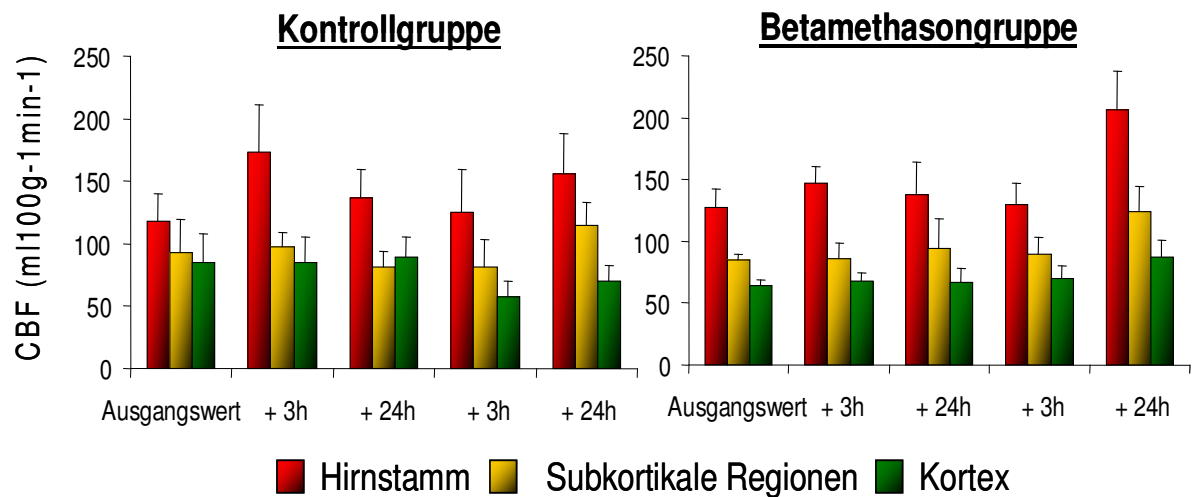
	pH	pCO <sub>2</sub> [mmHg]	pO <sub>2</sub> [mmHg]
<b>Kontrolltiere</b>			
Ausgangswert	$7,35 \pm 0,01$	$46,7 \pm 1,6$	$25,1 \pm 1,1$
nach 3h	$7,36 \pm 0,01$	$46,8 \pm 1,7$	$27,1 \pm 1,6$
nach 24h	$7,35 \pm 0,01$	$47,9 \pm 2,0$	$23,2 \pm 1,1$
nach 3h	$7,35 \pm 0,01$	$46,0 \pm 1,5$	$25,2 \pm 0,7$
nach 24h	$7,34 \pm 0,02$	$47,9 \pm 2,1$	$26,9 \pm 1,9$
<b>Betamethasontiere</b>			
Ausgangswert	$7,38 \pm 0,00$	$47,9 \pm 0,9$	$24,3 \pm 1,0$
nach 3h	$7,36 \pm 0,01$	$45,3 \pm 1,9$	$25,7 \pm 1,4$
nach 24h	$7,38 \pm 0,01$	$46,6 \pm 1,3$	$24,3 \pm 0,8$
nach 3h	$7,37 \pm 0,01$	$46,6 \pm 1,0$	$25,7 \pm 1,3$
nach 24h	$7,37 \pm 0,01$	$46,5 \pm 1,4$	$25,7 \pm 0,5$

MW  $\pm$  SEM, n=6 in der Kontrollgruppe, n=7 in der behandelten Gruppe

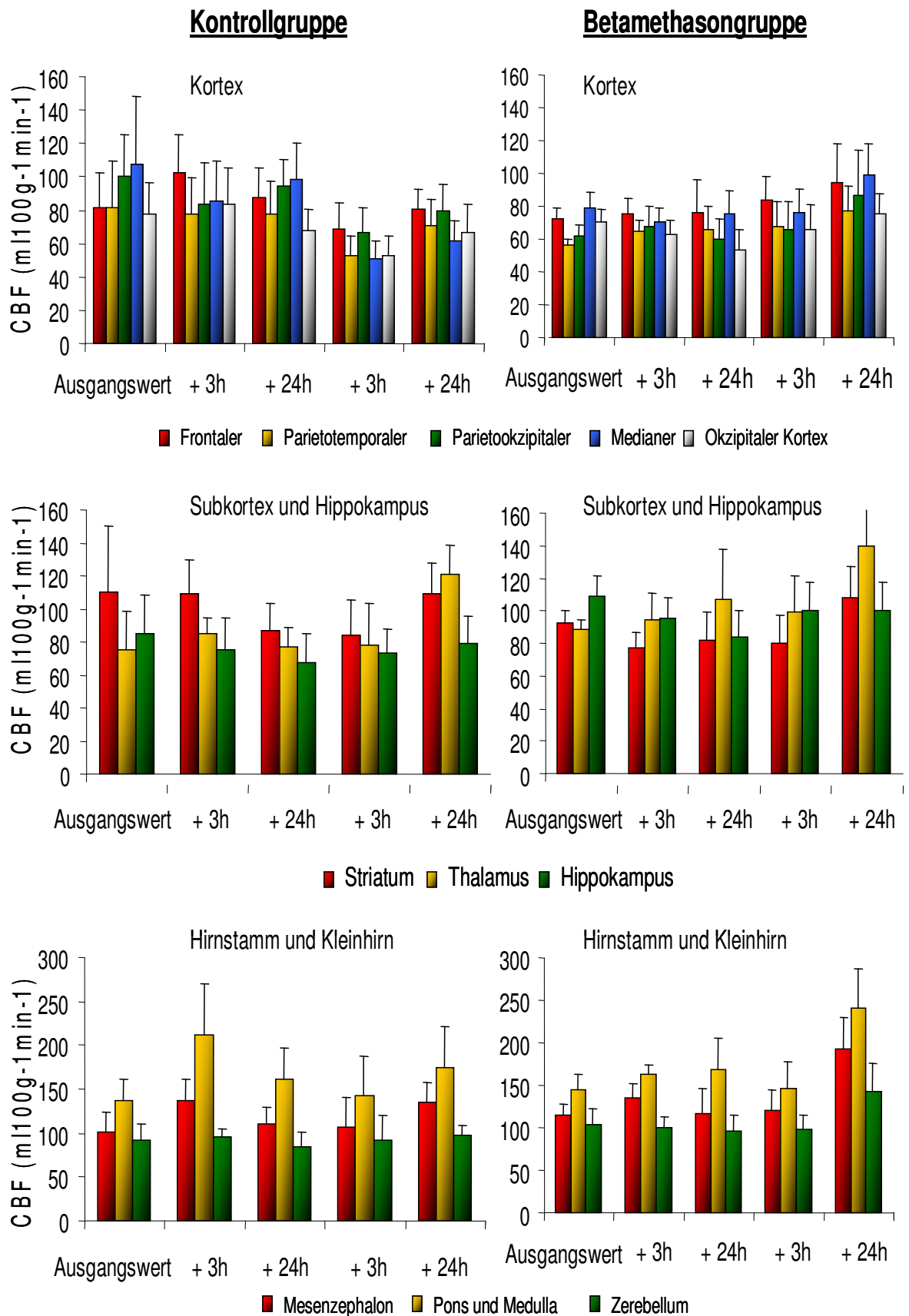
### 5.1.2.2. Glukokortikoideffekte zum Zeitpunkt 0,73 der Gestation

Um die Effekte einer Glukokortikoidbehandlung zum Zeitpunkt 0,73 der Gestation (110.Tag) auf die Hirndurchblutung zu bestimmen wurde vor, sowie jeweils 3h und 24h nach einer intramuskulären maternalen Betamethasoninjektion die fetale Hirndurchblutung gemessen.

Die Hirndurchblutung zeigte das für das Erwachsenengehirn typische Verteilungsmuster mit der größten Durchblutung im Hirnstamm und der niedrigsten im Kortex. Dabei war die Hirnstammdurchblutung  $54 \pm 5\%$  höher als in den subkortikalen Regionen (Striatum und Thalamus) und  $98 \pm 10\%$  höher als im Kortex ( $p \leq 0,05$ ). Zu keinem Zeitpunkt ließ sich ein signifikanter Unterschied der fetalen Hirndurchblutung zwischen der Kontrollgruppe und der mit Betamethason behandelten Gruppe feststellen (Abb.8 und 9).



**Abbildung 8** Fetale Hirndurchblutung vor, sowie jeweils 3h und 24h nach einer intramuskulären maternalen NaCl- oder Betamethasoninjektion (110 µg/kg Körpergewicht) zum Zeitpunkt 0,73 der Gestation, MW  $\pm$  SEM, n=6 in der Kontrollgruppe, n=7 in der behandelten Gruppe. Unterschiede zwischen den Regionen aus Übersichtlichkeit nicht dargestellt.



**Abbildung 9** Fetale Hirndurchblutung vor, sowie jeweils 3h und 24h nach einer maternalen intramuskulären NaCl- oder Betamethasoninjektion (110 µg/kg Körpergewicht) zum Zeitpunkt 0,73 der Gestation in den einzelnen Hirnregionen, MW ± SEM, n=6 in der Kontrollgruppe, n=7 in der behandelten Gruppe



### 5.1.3. Glukokortikoideffekte auf die fetale Hirndurchblutung zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation

#### 5.1.3.1. Physiologische Variablen

Alle Tiere befanden sich während des Beobachtungszeitraumes in einem gutem Allgemeinzustand. Die Feten waren alle gleich alt, das Trächtigkeitsalter in der Kontrollgruppe betrug zum Zeitpunkt der Hirndurchblutungsmessung  $128 \pm 1$  Tage, in der Betamethasongruppe  $129 \pm 1$  Tage.

Auch hinsichtlich des Gehirngewichtes (Kontrollgruppe  $34,7 \pm 2,4$  g, Betamethasongruppe  $34,6 \pm 2,1$  g) ergaben sich keine Unterschiede. Das Körpergewicht der Feten betrug  $3,3 \pm 0,16$  kg (Kontrollgruppe  $3,3 \pm 0,2$  kg, Betamethasongruppe  $3,3 \pm 0,1$  kg).

Die pH-Werte und die arteriellen Blutgase im fetalen Blut blieben während der Experimente in der Kontroll- und Betamethasongruppe unverändert (Tab.6).

**Tabelle 6** Übersicht über den pH-Wert und den arteriellen Kohlendioxid- und Sauerstoffpartialdruck im fetalen Blut vor, sowie jeweils 3h und 24 nach einer intramuskulären NaCl- oder Betamethasoninjektion ( $170\mu\text{g/kg}$  Körpergewicht) zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation

	pH	pCO <sub>2</sub> [mmHg]	pO <sub>2</sub> [mmHg]
<b>Kontrolltiere</b>			
Ausgangswert	7,37 $\pm$ 0,01	47,1 $\pm$ 1,1	22,8 $\pm$ 1,2
nach 3h	7,35 $\pm$ 0,01	49,5 $\pm$ 1,6	23,9 $\pm$ 1,4
nach 24h	7,35 $\pm$ 0,01	47,4 $\pm$ 3,2	20,7 $\pm$ 1,6
nach 3h	7,35 $\pm$ 0,01	49,5 $\pm$ 2,6	20,6 $\pm$ 1,1
nach 24h	7,34 $\pm$ 0,01	48,6 $\pm$ 3,2	21,3 $\pm$ 2,1
<b>Betamethasontiere</b>			
Ausgangswert	7,36 $\pm$ 0,01	47,4 $\pm$ 1,7	22,9 $\pm$ 0,9
nach 3h	7,34 $\pm$ 0,01	45,1 $\pm$ 1,7	23,8 $\pm$ 0,9
nach 24h	7,33 $\pm$ 0,02	45,6 $\pm$ 1,4	24,2 $\pm$ 0,8
nach 3h	7,35 $\pm$ 0,01	46,8 $\pm$ 1,3	23,7 $\pm$ 1,2
nach 24h	7,37 $\pm$ 0,01	45,0 $\pm$ 1,3	25,3 $\pm$ 2,6

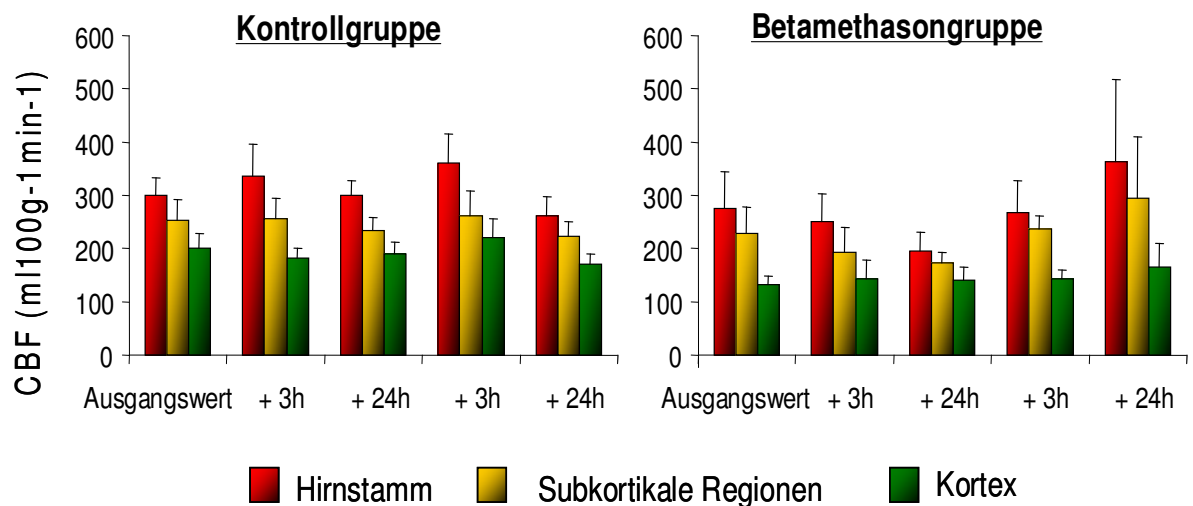
MW  $\pm$  SEM, n=7 in der Kontrollgruppe, n=6 in der behandelten Gruppe

### 5.1.3.2. Glukokortikoideffekte zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation

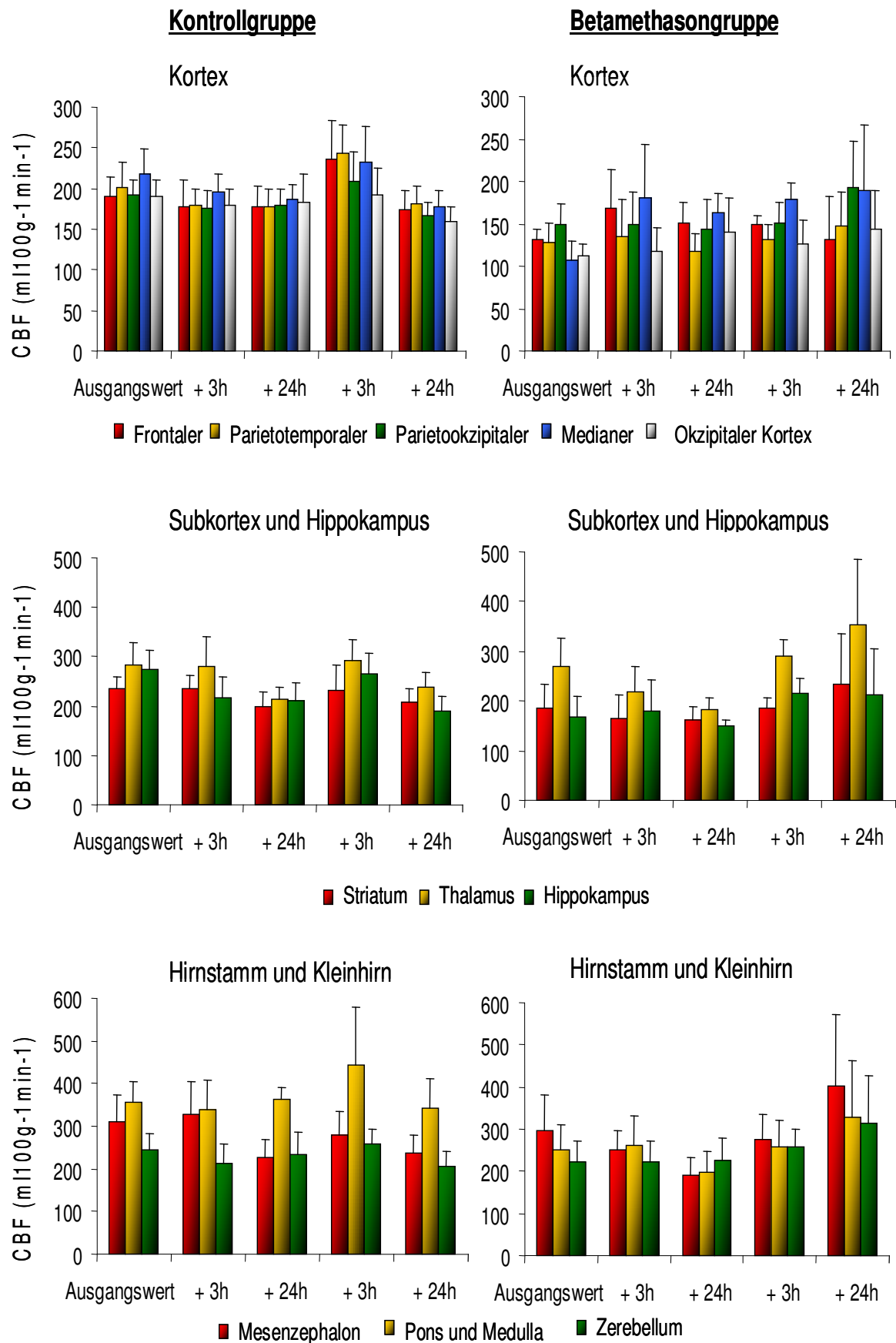
Zur Ermittlung der Effekte einer Glukokortikoidbehandlung zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation (128.Tag) auf die Hirndurchblutung wurde vor, sowie jeweils 3 und 24h nach einer intramuskulären maternalen Betamethasonapplikation die fetale Hirndurchblutung gemessen.

Die Hirndurchblutung zeigte das für das Erwachsenengehirn typische Verteilungsmuster mit der größten Durchblutung im Hirnstamm und der niedrigsten im Kortex. Dabei war die Hirnstammdurchblutung durchschnittlich  $24 \pm 3\%$  höher als in den subkortikalen Regionen und  $74 \pm 9\%$  höher als im Kortex ( $p \leq 0,05$ ).

Zu keinem Zeitpunkt ließ sich zwischen Kontrollgruppe und behandelter Gruppe ein signifikanter Unterschied der fetalen Hirndurchblutung feststellen (Abb.10 und 11).



**Abbildung 10** Fetale Hirndurchblutung vor, sowie jeweils 3h und 24h nach intramuskulärer maternaler NaCl- oder Betamethasoninjektion ( $170\mu\text{g/kg}$  Körpergewicht) zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation,  $\text{MW} \pm \text{SEM}$ ,  $n=7$  in der Kontrollgruppe,  $n=6$  in der behandelten Gruppe. Unterschiede zwischen den Regionen aus Übersichtlichkeit nicht dargestellt.



**Abbildung 11** Fetale Hirndurchblutung vor, sowie jeweils 3h und 24h nach einer maternalen intramuskulären NaCl- oder Betamethasoninjektion (170µg/kg Körpergewicht) zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation in den einzelnen Hirnregionen, MW ± SEM, n=7 in der Kontrollgruppe, n=6 in der behandelten Gruppe

## 5.2. Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die fetale Hirndurchblutung in Abhängigkeit von den Schlafstadien

### 5.2.1. Physiologische Variablen

Die Tiere befanden sich während des gesamten Beobachtungszeitraumes in einem guten Allgemeinzustand. Zwischen der Kontrollgruppe und der mit Betamethason behandelten Gruppe gab es keine Unterschiede hinsichtlich des Trächtigkeitsalters ( $129 \pm 1$  Tage in der Kontrollgruppe,  $128 \pm 1$  Tage in der Betamethasongruppe zum Zeitpunkt der Hirndurchblutungsmessung). Alle Feten waren gleich schwer ( $3,3 \pm 0,2$  kg in der Kontrollgruppe,  $3,1 \pm 0,1$  kg in der Betamethasongruppe).

Die pH-Werte und die arteriellen Blutgase im fetalen Blut blieben während der gesamten Experimente konstant (Tab.7).

**Tabelle 7** Übersicht über pH-Wert, arteriellen Kohlendioxid- und Sauerstoffpartialdruck im fetalen Blut zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation nach maternaler NaCl- bzw. Betamethasoninjektion ( $170\mu\text{g/kg}$  Körpergewicht).

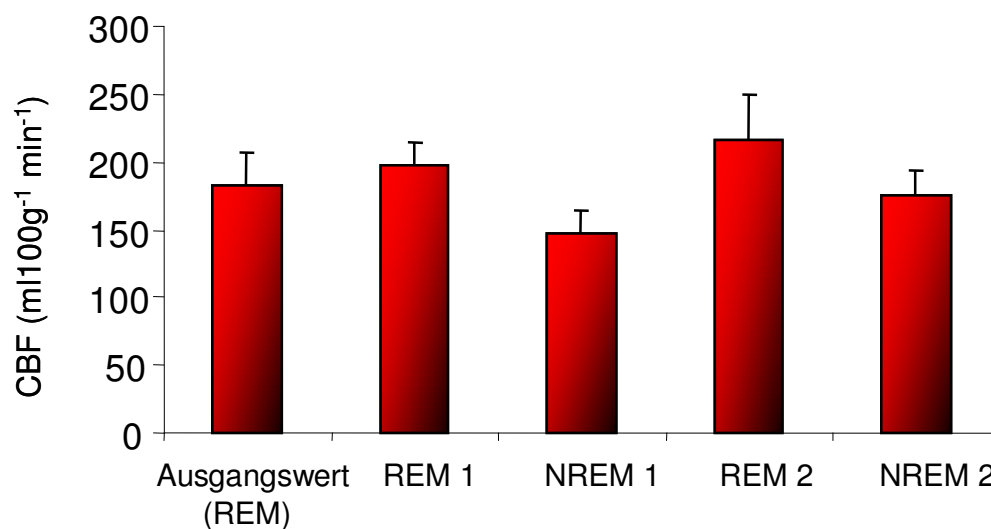
	pH	pCO <sub>2</sub> [mmHg]	pO <sub>2</sub> [mmHg]
<b>Kontrolltiere</b>			
24h nach der 1. Injektion:			
- REM	7,35 $\pm$ 0,01	48,0 $\pm$ 1,7	23,2 $\pm$ 1,5
- NREM	7,34 $\pm$ 0,01	47,3 $\pm$ 3,9	21,0 $\pm$ 2,2
4h nach der 2. Injektion:			
- REM	7,34 $\pm$ 0,01	50,5 $\pm$ 2,9	21,1 $\pm$ 1,2
- NREM	7,34 $\pm$ 0,01	48,7 $\pm$ 3,9	21,5 $\pm$ 2,5
<b>Betamethasontiere</b>			
24h nach der 1. Injektion:			
- REM	7,36 $\pm$ 0,01	47,9 $\pm$ 1,8	23,1 $\pm$ 1,4
- NREM	7,36 $\pm$ 0,01	49,3 $\pm$ 1,1	22,8 $\pm$ 1,1
4h nach der 2. Injektion:			
- REM	7,33 $\pm$ 0,02	46,9 $\pm$ 1,4	26,0 $\pm$ 1,3
- NREM	7,35 $\pm$ 0,01	47,6 $\pm$ 1,4	24,3 $\pm$ 0,5

MW  $\pm$  SEM, n=7 in der Kontrollgruppe, n=10 in der Betamethasongruppe

### 5.2.2. Abhängigkeit der fetalen Hirndurchblutung von den Schlafstadien

Die fetale Hirndurchblutungsmessung wurde 24 Stunden nach der ersten NaCl- bzw. Betamethasoninjektion jeweils im Abstand von einer halben Stunde im REM-Schlaf und NREM-Schlaf (REM 1 und NREM 1) durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte die zweite Betamethasoninjektion und jeweils 4 bzw. 4,5 Stunden nach der zweiten Injektion wurde die Hirndurchblutung wiederum im REM- und NREM-Schlaf bestimmt (REM 2 und NREM 2).

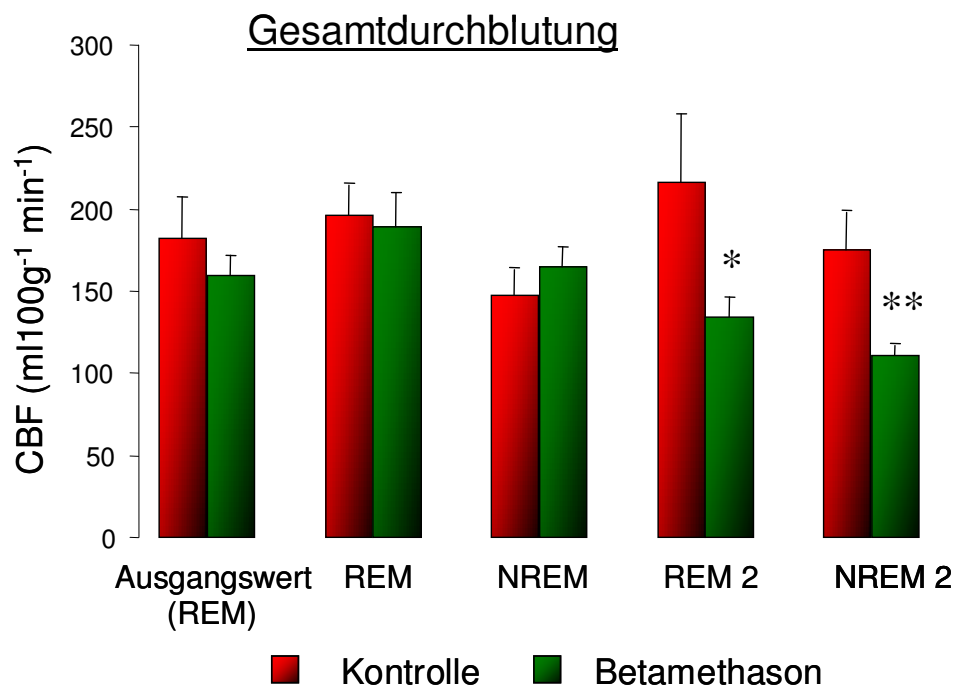
Unter Kontrollbedingungen fand sich im REM-Schlaf eine Erhöhung der Hirndurchblutung, währenddessen im NREM-Schlaf eine Erniedrigung auffiel. In Abb. 12 erkennt man tendenziell den typischen Wechsel zwischen REM- und NREM-Schlaf an der wechselnd erhöhten und erniedrigten Hirndurchblutung. Statistisch war dieses Phänomen möglicherweise aufgrund der niedrigen Tieranzahl im Verhältnis zur Streuung bei den Mikrosphärenmessungen nicht zu sichern.



**Abbildung 12** Veränderungen der fetalen Hirndurchblutung zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation in Abhängigkeit von den Schlafstadien, MW  $\pm$  SEM, n=7

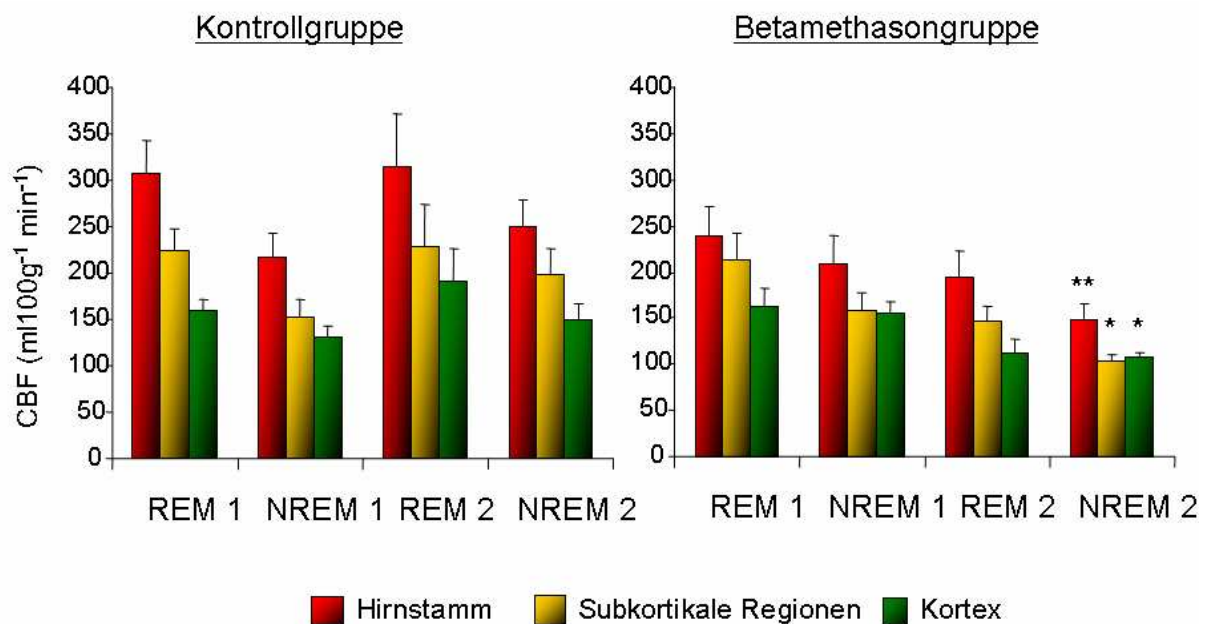
### 5.2.3. Glukokortikoideffekte auf die schlafstadienabhängigen Schwankungen der fetalen Hirndurchblutung

24 Stunden nach der ersten Betamethasoninjektion ließen sich auch in der Betamethasongruppe tendenziell die schlafstadienabhängigen Schwankungen der fetalen Hirndurchblutung parallel zur Kontrollgruppe nachweisen. 4 bzw. 4,5 Stunden nach der zweiten Gabe kam es unter Betamethason zu einem Abfall der Hirndurchblutung im REM- und im NREM-Schlaf (Gesamtgehirn  $p \leq 0,05$  im REM-Schlaf,  $p \leq 0,01$  im NREM-Schlaf) (Abb. 13). Die typischen Schwankungen der Hirndurchblutung in Abhängigkeit von den Schlafstadien wurden dadurch unterdrückt.

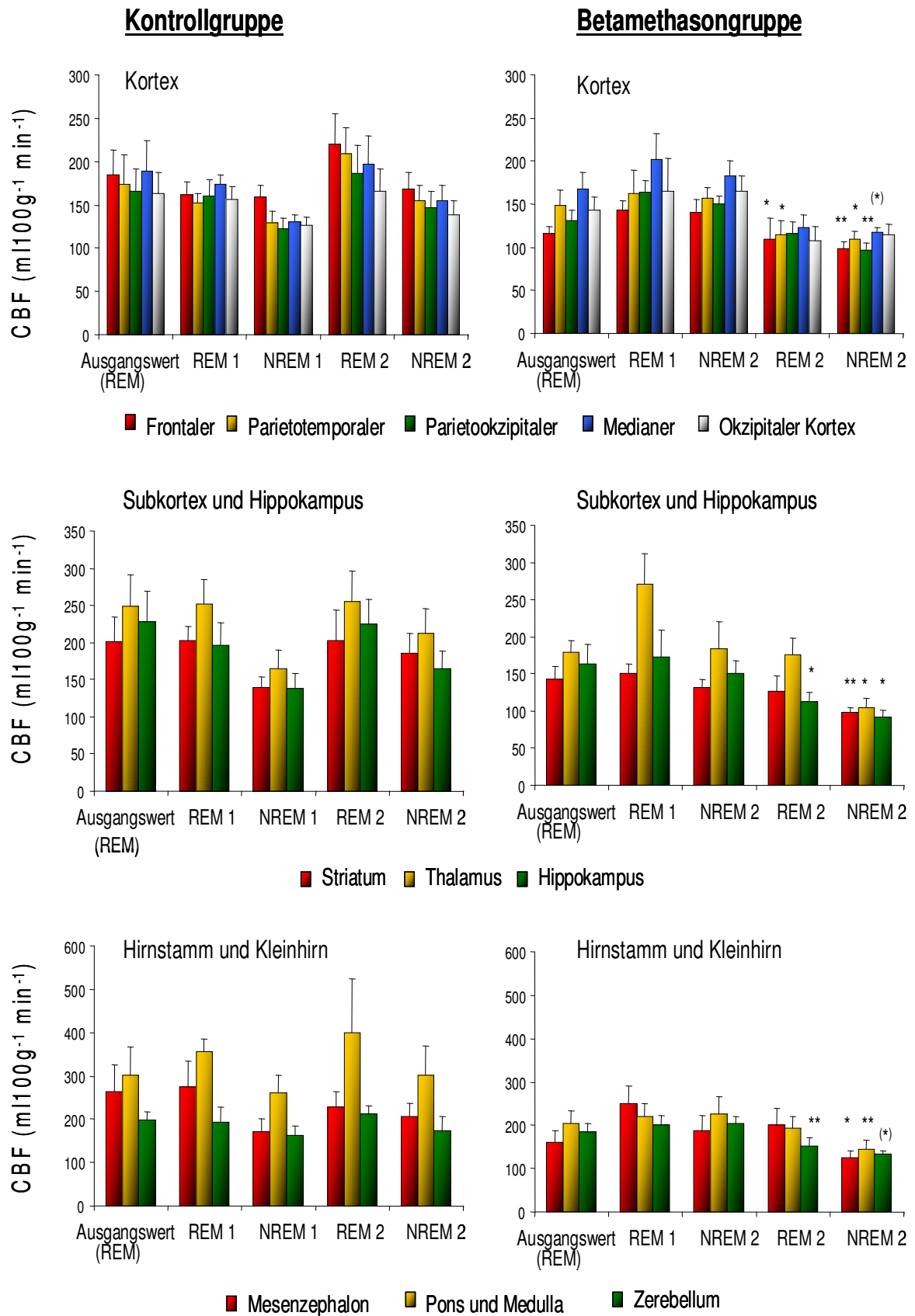


**Abbildung 13** Veränderungen der Gesamtdurchblutung zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation nach einem maternalen NaCl- oder Betamethasonbehandlungszyklus (zweimal 170 µg/kg Körpergewicht) in Abhängigkeit von den Schlafstadien, MW ± SEM, n=7 in der Kontrollgruppe, n=10 in der mit Betamethason behandelten Gruppe, \*\* $p \leq 0,01$  bzw. \* $p \leq 0,05$  im Vergleich zum Kontrollgruppe

4 Stunden nach der zweiten Injektion war die Durchblutung im REM-Schlaf im frontalen Kortex, im parietotemporalen Kortex und im Hippokampus ( $p \leq 0,05$ ), sowie im Pons und in der Medulla ( $p \leq 0,01$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt. Nach 4,5 Stunden, im NREM-Schlaf, ließ sich ein Abfall der Hirndurchblutung in allen Hirnregionen außer dem okzipitalen Kortex und dem Kleinhirn ( $p \leq 0,01$  im Hirnstamm, frontalem Kortex und Striatum,  $p < 0,05$  für alle anderen Regionen) in der Betamethasongruppe nachweisen (Abb. 14 und 15).



**Abbildung 14** Veränderungen der Durchblutung im Hirnstamm, in den subkortikalen Regionen und im Kortex zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation nach einem maternalen NaCl- oder Betamethasonbehandlungszyklus (zweimal 170µg/kg Körpergewicht) in Abhängigkeit von den Verhaltensstadien, MW ± SEM, n=7 in der Kontrollgruppe, n=10 in der mit Betamethason behandelten Gruppe, \*\* $p \leq 0,01$  bzw. \* $p \leq 0,05$  im Vergleich zum Kontrollgruppe



**Abbildung 15** Veränderungen der Durchblutung in den einzelnen Hirnregionen zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation nach einem maternalen NaCl- oder Betamethasonbehandlungszyklus (zweimal 170µg/kg Körpergewicht) in Abhängigkeit von den Schlafstadien, MW ± SEM, n=7 in der Kontrollgruppe, n=10 in der mit Betamethason behandelten Gruppe, \*\*p≤0,01, \*p≤0,05 bzw. (\*)p≤0,06 im Vergleich zum Kontrollgruppe



### **5.3. Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die fetale Hirndurchblutung unter asphyktischen Bedingungen**

#### **5.3.1. Physiologische Variablen**

Alle untersuchten Tiere befanden sich während des Beobachtungszeitraumes in einem guten Allgemeinzustand. Das Trächtigkeitssalter war in beiden Gruppen gleich und betrug zur Nabelschnurokklusion in der Kontrollgruppe  $127 \pm 1$  Tage und in der behandelten Gruppe  $127 \pm 0$  Tage. Hinsichtlich des fetalen Gewichtes fanden sich zum Zeitpunkt der Sektion keine signifikanten Unterschiede in der Kontrollgruppe und in der behandelten Gruppe (Kontrollgruppe  $2,9 \pm 0,19$  kg, Betamethasongruppe  $2,6 \pm 0,15$  kg).

Die arteriellen Blutgase und der pH-Wert im fetalen Blut blieben – mit Ausnahme während der vier Nabelschnurokklusionen ( $p \leq 0,05$ ) – im Verlaufe der Experimente konstant (Tab.8, UCO entspricht einem Mittelwert aus den jeweils vor und nach den einzelnen Nabelschnurokklusionen gemessenen Werten).

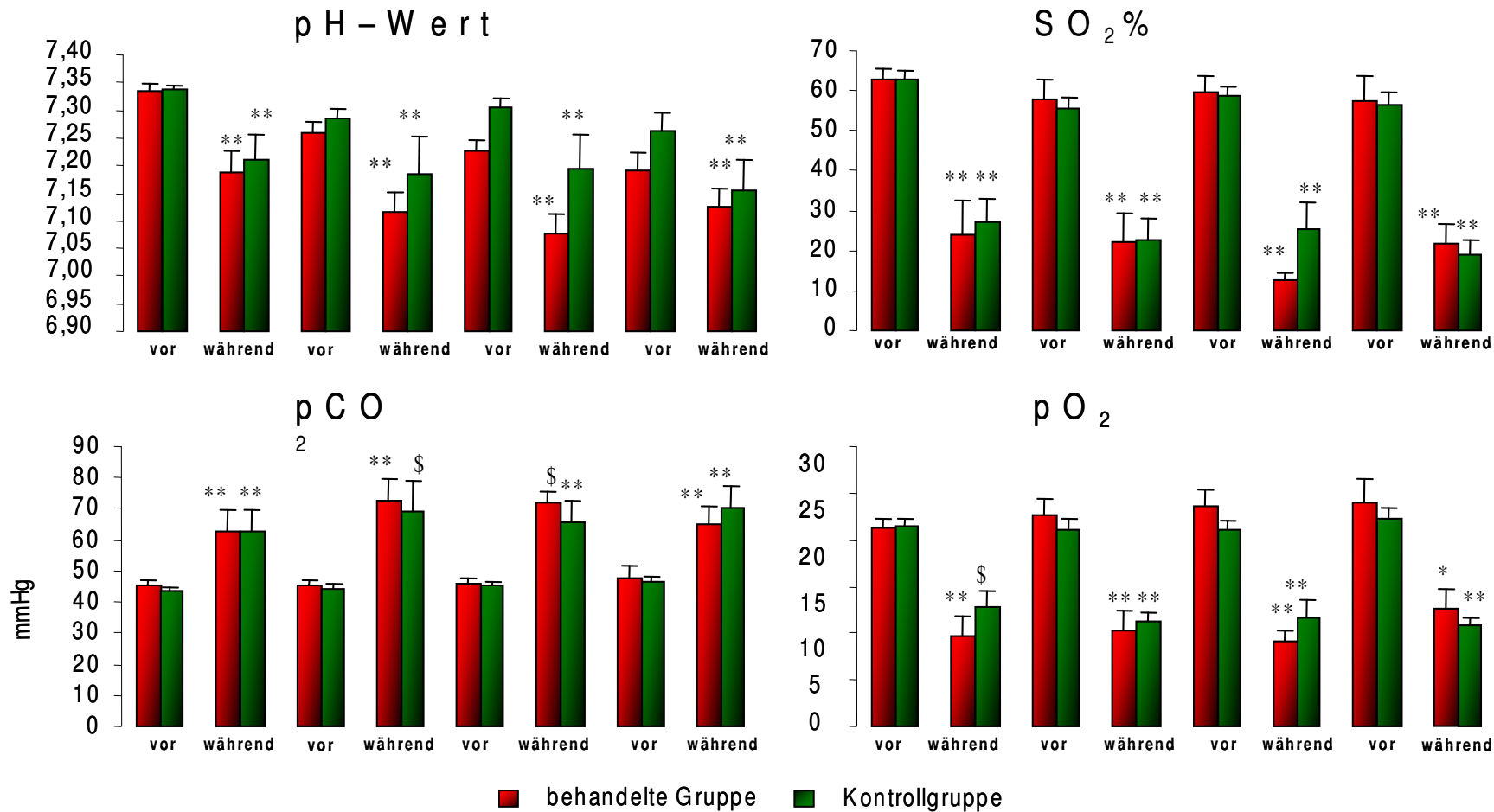
In der mit Betamethason behandelten Gruppe waren 2 und 24 Stunden nach den Nabelschnurokklusionen im Vergleich zu den Ausgangswerten die Glukose- und Laktatspiegel erhöht ( $p \leq 0,01$ ). Auch in der Kontrollgruppe fand sich 2 Stunden nach der Asphyxie ein Anstieg der Laktatwerte verglichen mit den Ausgangswerten ( $p \leq 0,01$ ). Der Anstieg war jedoch in der Betamethasongruppe deutlich höher, so dass sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und behandelter Gruppe sowohl 2 ( $p \leq 0,01$ ) als auch 24 Stunden ( $p \leq 0,01$  für Glukose,  $p \leq 0,05$  für Laktat) nach der Asphyxie nachweisen ließ. Zusätzlich ergab sich ein Anstieg der Laktatwerte 2 Minuten nach der Asphyxie in beiden Gruppen ( $p \leq 0,05$ ) (Tab.8).

Betrachtet man die vier Nabelschnurokklusionen einzeln findet man jeweils während der Okklusionen einen Abfall des pH-Wertes ( $p \leq 0,01$ ), der arteriellen Sauerstoffsättigung ( $p \leq 0,01$ ) und des Sauerstoffpartialdruckes ( $p \leq 0,08$  in der Kontrollgruppe während der 1.Nabelschnurokklusion,  $p \leq 0,05$  in der Betamethasongruppe während der 4.Nabelschnurokklusion,  $p \leq 0,01$  für alle weiteren Werte) sowie einen Anstieg des Kohlendioxidpartialdruckes ( $p < 0,08$  in der Kontrollgruppe während der 2.Nabelschnurokklusion, für die Betamethasongruppe während der 3.Nabelschnurokklusion,  $p \leq 0,01$  für die restlichen Werte, Abb. 16).

**Tabelle 8** Veränderungen von arteriellem Kohlendioxid- ( $p\text{CO}_2$ ) und Sauerstoffpartialdruck ( $p\text{O}_2$ ), Sauerstoffsättigung ( $\text{SO}_2$ ), pH-Wert, Glukose und Laktat im fetalen Blut im Verlauf der Experimente,

Kontrolltiere	pH-Wert	$p\text{CO}_2$ [mmHg]	$p\text{O}_2$ [mmHg]	$\text{SO}_2$ [%]	Glukose	Laktat
Ausgangswert	7,35 $\pm$ 0,01	45,9 $\pm$ 1,5	21,4 $\pm$ 0,9	64,6 $\pm$ 1,4	0,9 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1
nach 24h	7,34 $\pm$ 0,01	46,6 $\pm$ 1,3	22,9 $\pm$ 1,6	61,8 $\pm$ 2,3	0,9 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1
UCO + 2min	7,24 $\pm$ 0,04 <sup>*</sup>	55,8 $\pm$ 4,7 <sup>*</sup>	16,5 $\pm$ 1,2 <sup>*</sup>	41,0 $\pm$ 3,9 <sup>*</sup>	0,8 $\pm$ 0,1	5,7 $\pm$ 0,7 <sup>*</sup>
UCO + 2h	7,37 $\pm$ 0,01	46,7 $\pm$ 2,4	25,7 $\pm$ 4,0	70,3 $\pm$ 6,4	1,2 $\pm$ 0,1 <sup>§§</sup>	3,1 $\pm$ 0,5 <sup>§§</sup>
UCO + 24h	7,35 $\pm$ 0,01	47,5 $\pm$ 1,5	22,0 $\pm$ 2,5	60,3 $\pm$ 4,5	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>§§</sup>	1,8 $\pm$ 0,6 <sup>§</sup>
<b>Betamethasontiere</b>						
Ausgangswert	7,36 $\pm$ 0,01	46,5 $\pm$ 1,8	21,2 $\pm$ 0,9	60,8 $\pm$ 3,0	0,9 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,2
nach 24h	7,34 $\pm$ 0,02 <sup>*</sup>	45,2 $\pm$ 1,6 <sup>*</sup>	24,3 $\pm$ 2,5 <sup>*</sup>	67,5 $\pm$ 5,3 <sup>*</sup>	1,1 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,3
UCO + 2min	7,19 $\pm$ 0,03	57,0 $\pm$ 4,0	16,7 $\pm$ 1,8	39,8 $\pm$ 5,0	1,4 $\pm$ 0,1	7,1 $\pm$ 1,1 <sup>*</sup>
UCO + 2h	7,30 $\pm$ 0,02	44,1 $\pm$ 0,9	23,9 $\pm$ 2,0	64,2 $\pm$ 5,0	1,8 $\pm$ 0,2 <sup>§§</sup>	8,1 $\pm$ 1,1 <sup>§§</sup>
UCO + 24h	7,39 $\pm$ 0,02	47,2 $\pm$ 2,5	19,9 $\pm$ 0,8	58,5 $\pm$ 2,9	1,3 $\pm$ 0,1 <sup>§§</sup>	4,3 $\pm$ 1,0 <sup>§</sup>

MW + SEM, n=9 in der Kontrollgruppe, n=10 in der Betamethasongruppe, \*\*p<0,01 bzw. \*p<0,05 im Vergleich zu den Ausgangswerten, §§p<0,01 bzw. §p<0,05 zwischen Kontrollgruppe und Betamethasongruppe



**Abbildung 16** Veränderungen des pH-Wertes, der Sauerstoffsättigung und des arteriellen Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruckes im Verlaufe der 4 Nabelschnurokklusionen (UCO), jeweils vor und während einer UCO gemessen; MW + SEM, n=9 in der Kontrollgruppe, n=10 in der Betamethasongruppe; \*\*p<0,01, \*p<0,05, \$p<0,08 im Vergleich zu vor der UCO

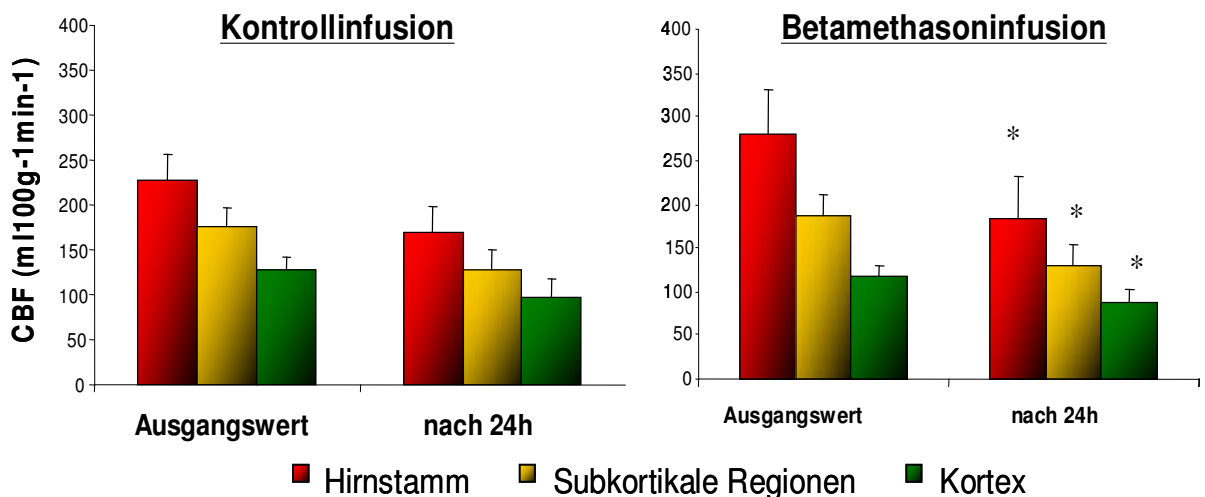
### 5.3.2. Glukokortikoideffekte auf die fetale Hirndurchblutung vor der Asphyxie

Hierzu wurde die fetale Hirndurchblutung vor und nach einer kontinuierlichen, intravenösen fetalen Betamethasoninfusion über 24 Stunden bestimmt.

Es zeigte sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch in behandelten Gruppe die für das Erwachsenengehirn typische Verteilung mit der größten Hirndurchblutung im Hirnstamm und der niedrigsten im Kortex. Die Hirnstammdurchblutung war  $39 \pm 6\%$  höher als die Durchblutung in den subkortikalen Regionen und  $111 \pm 15\%$  höher als im Kortex ( $p \leq 0,05$ ).

Bei den Kontrolltieren fand sich keine Änderung der regionalen Hirndurchblutung zwischen den Ausgangswerten und 24 Stunden nach Beginn der physiologischen NaCl-Infusion.

Bei den mit Betamethason behandelten Tieren konnte man einen signifikanten Abfall der Hirndurchblutung 24 Stunden nach Beginn der Betamethasoninfusion in allen Hirnregionen nachweisen ( $p \leq 0,05$ ; Gesamtgehirn, frontaler und medianer Kortex, Striatum  $p \leq 0,01$ ) (Abb. 17).



**Abbildung 17** Veränderungen der fetalen Hirndurchblutung (CBF) nach einer intravenösen NaCl- oder Betamethasonbehandlung; MW + SEM, n=9 in der Kontrollgruppe, n=10 in der Betamethasongruppe; \* $p \leq 0,05$  im Vergleich zu den Ausgangswerten

Die Parameter 24 Stunden nach Infusionsbeginn dienten als Ausgangswerte für die Untersuchung der fetalen Hirndurchblutung unter asphyktischen Bedingungen (5.3.3. und 5.3.4.).

### 5.3.3. Veränderungen der fetalen Hirndurchblutung nach einer Asphyxie

Während der Asphyxie erfolgte die kontinuierliche Messung relativer Hirndurchblutungsänderungen mit der Laser Doppler Flowmetry.

Mittels fluoreszierender Mikrosphären wurde die fetale Hirndurchblutung 2 Minuten, sowie 2 Stunden und 24 Stunden nach 4 aufeinanderfolgenden Nabelschnurokklusionen bestimmt.

In der Kontrollgruppe kam es in der Frühphase der Reperfusion 2 Minuten nach den Nabelschnurokklusionen zu einem Anstieg der Hirndurchblutung in allen Hirnregionen im Vergleich zu den Ausgangswerten auf durchschnittlich  $154 \pm 19\%$  (Gesamtgehirn, Hirnstamm, Mittelhirn, subkortikale Regionen, Thalamus, frontaler Kortex, parietokzipitaler Kortex, Kleinhirn  $p \leq 0,05$ ). Am stärksten war der Anstieg im Hirnstamm zu verzeichnen ( $192 \pm 32\%$ ).

Im Vergleich zu den Werten direkt nach den Nabelschnurokklusionen war der Anstieg der fetalen Hirndurchblutung zwei Stunden nach der Asphyxie nicht mehr nachweisbar und erreichte damit wieder Ausgangswerte (Gesamtgehirn, Hirnstamm, Mittelhirn, subkortikale Regionen, Thalamus sowie Hippokampus  $p \leq 0,05$ ).

24 Stunden nach den Nabelschnurokklusionen fand sich eine postasphyktische Hyperperfusion, die durchschnittlich auf das Gesamtgehirn bezogen  $203 \pm 14\%$  betrug ( $p \leq 0,05$ ). Maximal kam es zu einem Anstieg der Durchblutung im Kortex auf  $225 \pm 32\%$  (frontaler und okzipitaler Kortex  $p \leq 0,05$ ) und in den subkortikalen Regionen ( $226 \pm 37\%$ ,  $p \leq 0,05$ ). Die geringste Veränderung war im Hirnstamm zu verzeichnen ( $195 \pm 14\%$ ;  $p \leq 0,05$ ).

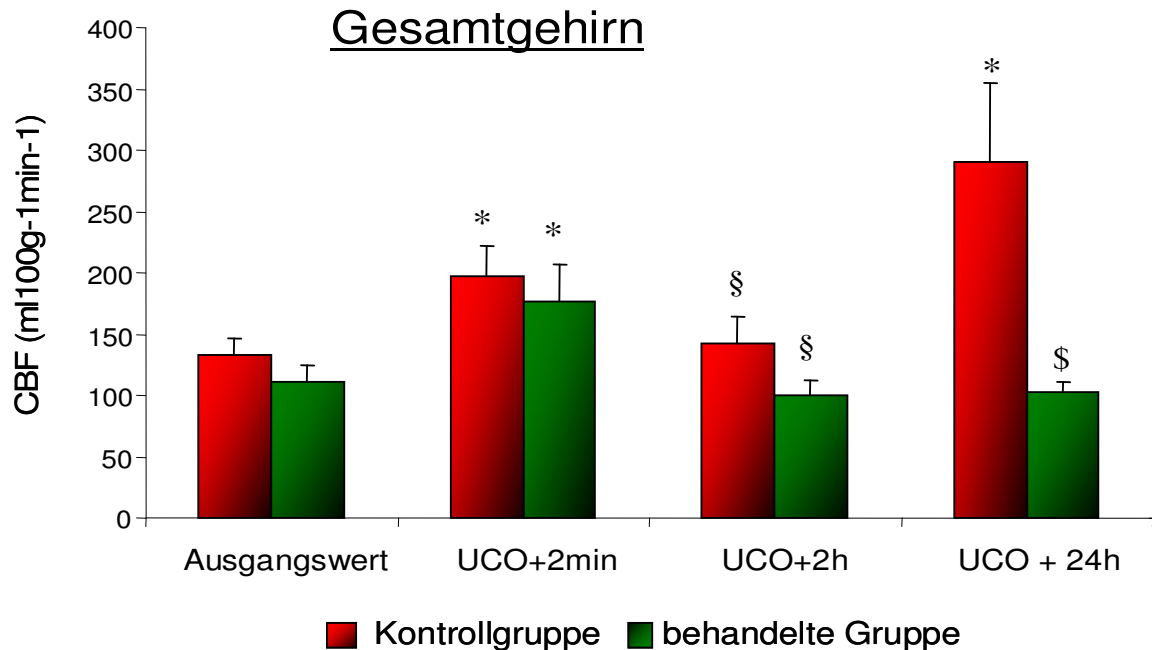
### 5.3.4. Veränderungen der fetalen Hirndurchblutung nach einer Asphyxie unter Glukokortikoideinfluss

Wie bei den Kontrolltieren zeigten die mit Betamethason behandelten Tiere eine erhöhte Hirndurchblutung während der frühen Phase der Reperfusion unmittelbar nach den Nabelschnurokklusionen (Gesamtgehirn, Hirnstamm, Mittelhirn, Pons, Medulla, subkortikale Regionen, Thalamus, Kortex, frontaler und parietookzipitaler Kortex)  $p \leq 0,05$ ). Es war ein Anstieg auf  $168 \pm 32\%$  feststellbar. Auch bei den Betamethasontieren war der stärkste Anstieg im Hirnstamm zu verzeichnen ( $187 \pm 46\%$ ).

Gegenüber den Werten direkt nach der Asphyxie war der Durchblutungsanstieg zwei Stunden nach den Nabelschnurokklusionen auch in der mit Betamethason

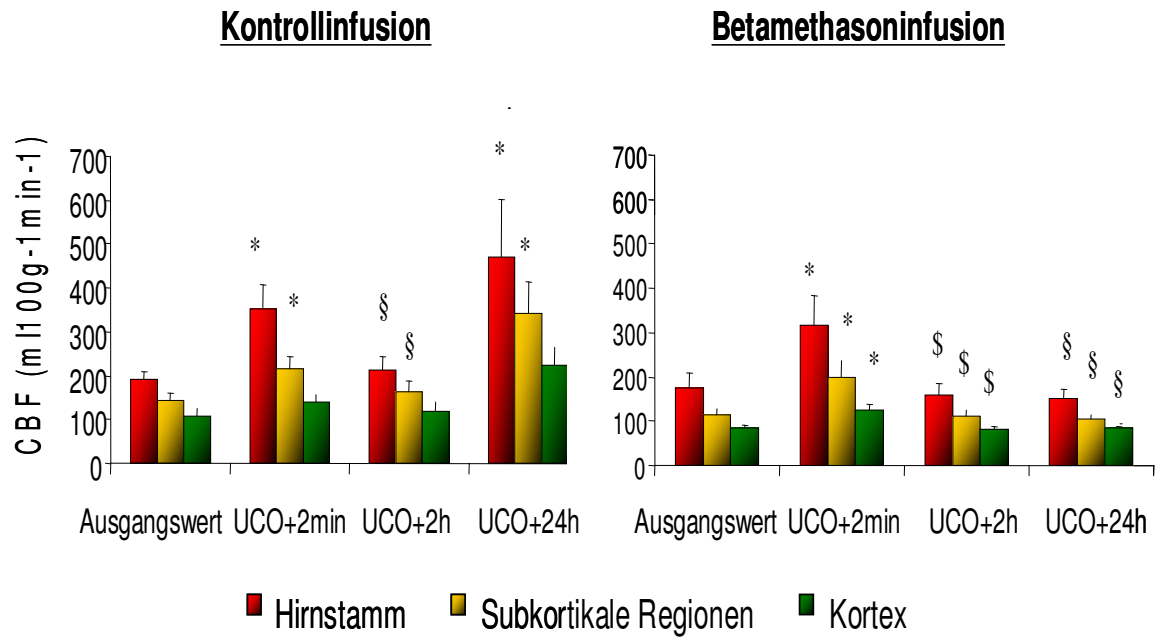
behandelten Gruppe nicht mehr feststellbar und erreichte wieder den Ausgangswert ( $p \leq 0,05$  für alle Hirnregionen mit Ausnahme von Striatum und parietotemporalem Kortex).

In der späten Phase der Reperfusion war im Gegensatz zu den Kontrollen eine postasphyktische Hyperperfusion in der Betamethasongruppe nicht nachzuweisen (Abb. 18).

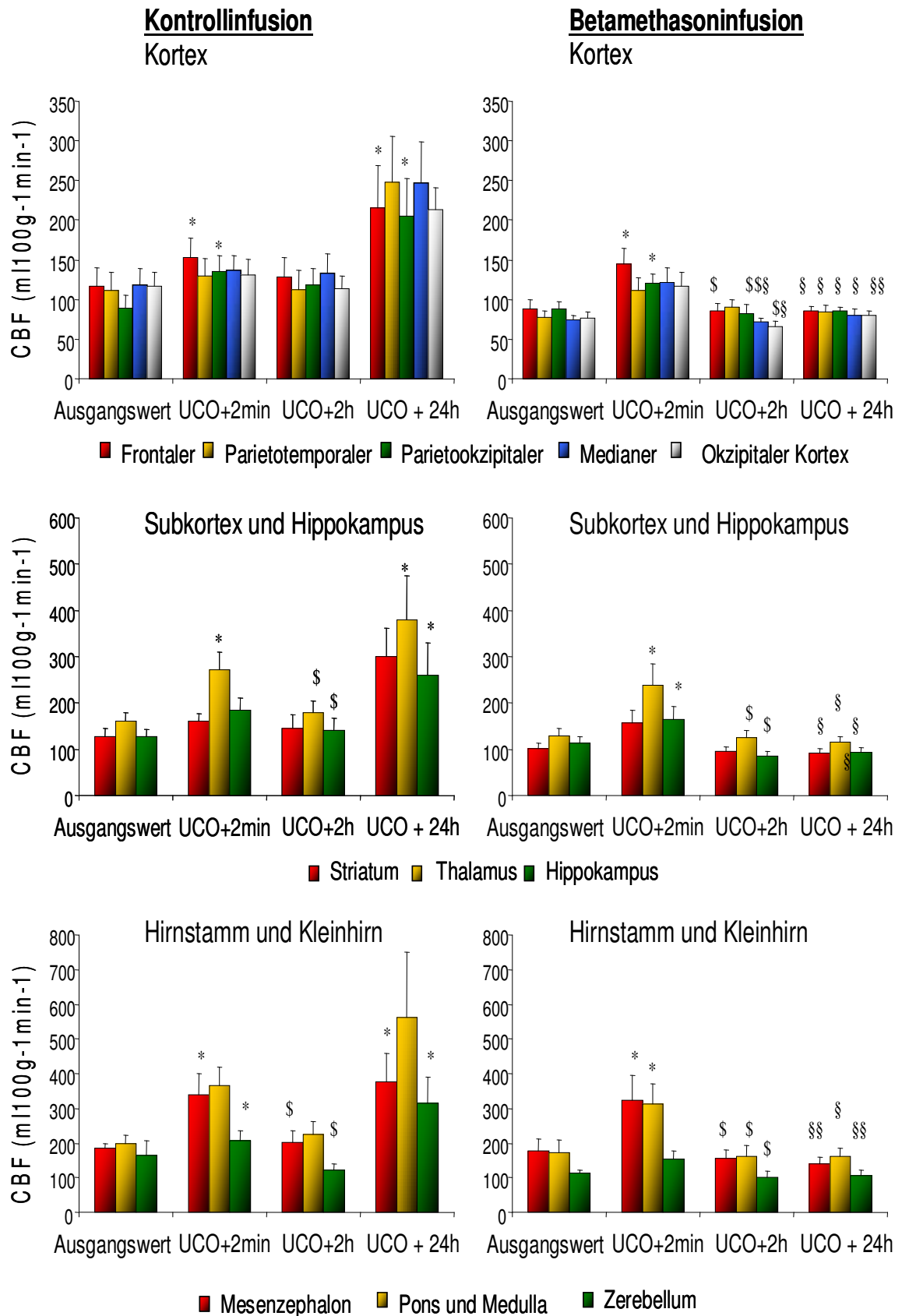


**Abbildung 18** Veränderungen der Durchblutung im Gesamtgehirn (CBF) nach einer Asphyxie mittels Nabelschnurokklusionen (UCO) und nach einer NaCl- oder Betamethasoninfusion, MW + SEM,  $n=9$  in der Kontrollgruppe,  $n=10$  in der Betamethasongruppe; \* $p < 0,05$  im Vergleich zum Ausgangswert, § $p < 0,05$  im Vergleich mit Werten 2min nach der UCO, \$ $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

In allen Hirnregionen war die Durchblutung 24 Stunden nach den Nabelschnurokklusionen in der mit Betamethason behandelten Gruppe niedriger als in der Kontrollgruppe (Okzipitalkortex, Mittelhirn und Kleinhirn  $p \leq 0,01$ , alle anderen Hirnregionen  $p \leq 0,05$ ). Zusätzlich fand sich im Okzipital- und Mediankortex eine erniedrigte Durchblutung 2 Stunden nach der Nabelschnurokklusion ( $p \leq 0,05$ ) (Abb. 19 und 20).



**Abbildung 19** Veränderungen der fetalen Hirndurchblutung (CBF) nach einer Asphyxie mittels Nabelschnurokklusionen (UCO) und nach einer NaCl- oder Betamethasonbehandlung; MW + SEM, n=9 in der Kontrollgruppe, n=10 in der Betamethasongruppe, \*p≤0,05 im Vergleich zu den Ausgangswerten, §p≤0,05 im Vergleich zu den Werten direkt nach der UCO, \$p≤0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe



**Abbildung 20** Änderungen der regionalen Hirndurchblutung (CBF) nach einer Asphyxie mittels Nabelschnurokklusionen (UCO) und einer NaCl- oder Betamethasonbehandlung, geordnet nach den einzelnen Hirnregionen; MW + SEM, n=9 in der Kontrollgruppe, n=10 in der Betamethasongruppe, \*p≤0,05 im Vergleich zu den Ausgangswerten, \$p≤0,05 im Vergleich zu Werten direkt nach der UCO, \$\$p≤0,01 bzw. \$p≤0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe.



## **6. Diskussion**

### **6.1. Methodische Betrachtungen**

#### **6.1.1. Der chronisch instrumentierte Schaffetus**

Der chronisch instrumentierte Schaffetus wird seit fast 40 Jahren als tierexperimentelles Modell genutzt. An diesem Modell wurde Ende der 60er Jahre erstmals der Nutzen einer pränatalen Glukokortikoidtherapie für die Reifung der fetalen Lunge nachgewiesen (Liggins 1967, Liggins 1969, Liggins und Howie 1972). Die intrauterine Entwicklung des Schaffetus gleicht der des menschlichen Fetus weit mehr als andere Tiermodelle, wie beispielsweise Ratten- oder Mausmodelle. Ratten und Mäuse kommen unreif zur Welt. Ihre Hirnentwicklung entspricht zur Geburt ungefähr dem siebten menschlichen Schwangerschaftsmonat (Hagberg und Mallard 2000). Dagegen beginnt beim Mensch die Alveolisierung der Lunge beispielsweise zum Zeitpunkt 0,8 der Gestation, beim Schaf zum Zeitpunkt 0,75 (Jobe 2003). Auch die neuronale Entwicklung und Myelinisierung von Mensch und Schaf ähnelt sich, selbst wenn das Schafgehirn zum Zeitpunkt der Geburt einen höheren Reifungsgrad als das menschliche Gehirn aufweist (Astrom 1967, Dobbing und Sands 1979).

Normalerweise sind beim Schaf, wie beim Menschen, Einlings- oder Zwillingsschwangerschaften zu erwarten. Des weiteren erlauben Größe und Konstitution des Schafes eine sichere chirurgische Instrumentierung.

Trotz des technischen und personellen Aufwandes, wurde in der vorliegenden Arbeit ein tierexperimentelles Fetalmodell gewählt, da erhebliche qualitative und quantitative Unterschiede zwischen Feten und Adulten bestehen. Das fetale Tiermodell stellt auch heute noch unsere wichtigste Quelle dar, um Informationen über das Leben vor der Geburt und die fetale Umwelt zu gewinnen und damit die Überlebenschance zu früh geborener Babys zu erhöhen sowie Risikofaktoren für die Entstehung kardiovaskulärer und anderer „idiopathischer“ Erkrankungen aufzuspüren.

#### **6.1.2. Das Asphyxiemodell**

Akute Sauerstoffversorgungsstörungen können durch eine Kompression der Nabelschnur, eine vorzeitige Lösung der Plazenta oder eine Uterusruptur

entstehen. Während der Eröffnungs- oder Austreibungsphase der Geburt kann es zu einem schweren Sauerstoffmangel des Feten kommen (Geburtsasphyxie). Beim Neugeborenen macht sich die Asphyxie durch eine schwere, vor allem metabolische Azidose im Nabelschnurblut, einen anhaltend erniedrigten Apgar-Score sowie durch funktionelle Störungen, die Ausdruck hypoxischer Schäden verschiedener Organe einschließlich des zentralen Nervensystems sind, bemerkbar. Neben der Morbidität und Mortalität in der Neonatalphase sind auch die Langzeitfolgen, wie eine Zerebralparese, von erheblicher Bedeutung (Übersicht in Schneider 2001).

Eine beim fetalen Schaf zum Zeitpunkt 0,85, also der 34.SSW beim Menschen entsprechend, durchgeführte mehrmalige mehrminütige Unterbrechung der Nabelschnur mit einem Nabelschnurokkluder, entspricht damit einer in der klinischen Praxis auftretenden Schwangerschaftskomplikation, besonders unter der Geburt (Schneider 2001).

Zur Verifizierung der in utero durchgeführten Nabelschnurokklusionen und zur Bewertung des Zustandes des Feten wurden arterielle Blutgase, Glukose und Laktat kontrolliert. Es kam auch in unseren Experimenten nach den Nabelschnurokklusionen zu einer Azidose, erkennbar am Abfall des pH-Wertes, einer hohen Laktatkonzentration und einem Anstieg des Kohlendioxidpartialdruckes im fetalen Blut, die sich nach 2 Stunden wieder zurückbildete. Die Azidose, sowie der Abfall der Sauerstoffsättigung und des Sauerstoffpartialdruckes und der erhöhte Kohlendioxidpartialdruck dienten dem Nachweis einer kompletten Nabelschnurokklusion und damit der Schwere des zugefügten Sauerstoffmangels. Da sich keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Betamethasongruppe nachweisen ließen, kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse nicht durch unterschiedlich schwere bzw. unvollständige Nabelschnurokklusionen beeinflusst wurden.

Wir entschieden uns angelehnt an Mallard et al. für vier vierminütige Nabelschnurokklusionen im Abstand von 26 Minuten, die im untersuchten Gestationsalter zu einer reproduzierbaren Hirnschädigung führen, aber gleichzeitig das Überleben des Feten sichern (Mallard et al. 1995). Eine längere oder öfter durchgeführte Nabelschnurokklusion führt zum Tod des Fetus. Jüngere Feten scheinen gegenüber hypoxischen Belastungen widerstandsfähiger zu sein. So überstehen unreife Schaffeten (0,6 der Gestation) auch 20 bis 30minütige Nabelschnurokklusionen (George et al.

2004), währenddessen am Ende der Trächtigkeit eine einmalige 10minütige Kompression die Grenze der Überlebensfähigkeit darstellt (Duncan et al. 2004).

### 6.1.3. Verwendete Glukokortikoide und Applikationsform

Entsprechend der Studie von Liggins und Howie werden in der Klinik der Mutter zweimal 12 mg Betamethason oder Dexamethason intramuskulär, im Abstand von 24 Stunden verabreicht (Liggins und Howie 1972). Beides sind Diastereoisomere, mit minimalen strukturellen Unterschieden, so dass sich auch ihre Pharmakokinetik ähnelt. Sie haben eine Plasmahalbwertszeit von ungefähr 3 bis 5 Stunden, eine lange biologische Halbwertszeit von 36 bzw. 54 Stunden und eine ähnliche Plasmaproteinbindung (78% bzw. 88%) (Trenque et al. 1994). Kleinere Unterschiede, wie geringere Peakkonzentrationen, aber eine längere biologische Aktivität von Dexamethason (Ballard und Liggins 1982) und eine schnellere Passage der Bluthirnschranke (Trenque et al. 1994) sind beschrieben wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mutter Betamethasonphosphat à 110µg/kg Körpergewicht (0,73 der Gestation) bzw. à 170µg/kg Körpergewicht (0,85 der Gestation) intramuskulär verabreicht. Dies entspricht der empfohlenen Dosis von zweimal 8 bzw. 12 mg im Abstand von 24 Stunden (NIH 1995). Prinzipiell konnten wir aber in Vorversuchen keinen stärkeren Effekt auf das periphere oder zerebrale Gefäßsystem mit 2x12mg als mit 2x8mg Betamethason oder intravenösen Infusionen, die wesentlich niedrigere fetale Plasmaspiegel induzieren, nachweisen, was ein Indiz dafür ist, dass auch schon die klinisch zur Lungenreifung verwendete intramuskuläre Dosis von 2x8mg eine supramaximale Dosis bezüglich der vaskulären Effekte darstellt (Schwab et al 2006, in Druck).

Bei den Asphyxieversuchen wurde Betamethason nicht wie in den anderen Versuchsgruppen intramuskulär gegeben, sondern mittels fetaler Direktinfusion, wie in vorangegangenen Untersuchungen, die einen Abfall der fetalen Hirndurchblutung um durchschnittlich 25-30% zeigen konnten (Schwab et al. 2000, Löhle et al. 2005). Das Design wurde gewählt, um Plazentagängigkeitsunterschiede zwischen Mensch und Schaf auszuschließen. Dem Fetus wurden 3,3µg Betamethason pro kg Körpergewicht pro Stunde über 48 Stunden intravenös infundiert. Die Infusionsrate wurde so gewählt, dass sie zu einer fetalen Plasmakonzentration an Betamethason führte, die der im

Plasma der humanen Nabelschnur 24 Stunden nach mütterlicher Glukokortikoidbehandlung glich (Petersen et al. 1980, Kream et al. 1983). Es wurde darauf geachtet, dass Betamethason auch nach der repetitiven Nabelschnurokklusion für weitere 24 Stunden anhaltend infundiert wurde, um eine Asphyxie während der Glukokortikoidgabe zu demonstrieren und die Pharmakokinetik mit einer verzögerten Glukokortikoidfreisetzung nach mütterlicher i.m. Gabe in der Klinik zu imitieren.

#### **6.1.4. Pharmakokinetische Unterschiede zwischen intramuskulärer maternaler und intravenöser fetaler Applikation**

Die Betamethasonkonzentrationen im mütterlichen Kreislauf erreichen bereits nach 15 Minuten ihren Peak und fallen dann exponentiell ab, bis sie sich 8 bis 12 Stunden nach der Injektion nicht mehr nachweisen lassen. Im fetalen Plasma lassen sich erst nach einer Stunde erste Betamethasonkonzentrationen finden, nach drei Stunden ist die Höchstkonzentration erreicht und nach 6 bis 12 Stunden liegt die fetale Betamethasonkonzentration bei Messung mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) unterhalb der unteren Nachweisgrenze (Schwab et al 2006, in Druck). Dreifach höhere Betamethasondosen führen nach maternaler Gabe beim Schaf ebenfalls nach zwei bis vier Stunden zu Maximalkonzentrationen im fetalen Blut (Moss et al. 2003). Beim Menschen scheint die Verteilung von Betamethason in der fetalen Zirkulation ähnlich zu sein (Ballard et al. 1975). Gemessen werden die Veränderungen bei Schwangeren, die unter Glukokortikoideinfluss entbunden haben, allerdings im Nabelschnurblut nach variablen Zeiten nach der Betamethasongabe, so dass sich die Erstellung eines genauen Plasmaprofils schwierig gestaltet.

Bei fetaler intravenöser Infusion sind die Spitzenspiegel deutlich niedriger, aber es wird über den gesamten Zeitraum von 48 Stunden eine kontinuierliche Betamethasonkonzentration aufrechterhalten. Insgesamt werden jedoch ähnliche Plasmakonzentrationen wie bei intramuskulärer Gabe erreicht. Die fetale Gabe ist nur experimentell möglich. Sie schließt den Effekt, den die Passage der Plazenta eventuell bei maternaler Gabe hat, aus.

Die Peakkonzentration nach maternaler Gabe spielt möglicherweise eine geringere Rolle für die Aktivierung der Glukokortikoidrezeptoren und damit die zerebrale Vasokonstriktion als ein bestimmter kontinuierlicher Spiegel, wie nach

fetaler Infusion. Dies scheint aber abhängig von den Zielparametern zu sein. So fand sich im Elektroenzephalogramm nach fetaler intravenöser und maternaler intramuskulärer Gabe kein Unterschied der Betamethasonwirkung auf die zerebrale Erregbarkeit (Schmidt et al. 2002). Bei diesen Betrachtungen ist jedoch die biologische Wirksamkeit von Betamethason an den Glukokortikoidrezeptoren nicht berücksichtigt, die viel länger ist als die nachweisbaren Plasmaspiegel.

#### **6.1.5. Mögliche Plazentapassagebehinderung von synthetischen Glukokortikoiden durch Effluxtransporter**

Schon lange ist bekannt, dass mütterliches Kortisol beim Durchtritt durch die Plazenta durch ein Enzym, die 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2 (11 $\beta$ -HSD 2), inaktiviert wird (Benediktsson et al. 1997, Shams et al. 1998, Burton und Waddell 1999, Krozowski 1999). 11 $\beta$ -HSD 2 ist ein Enzym, das Kortisol und Kortikosteron in ihre inaktiven Metaboliten Kortison und 11-Dehydrokortison umbaut und damit, lokalisiert im Synzytiotrophoblasten von Mensch und Tier, eine Schrankenfunktion einnimmt (Benediktsson et al. 1997).

In vitro Studien an der humanen Plazenta haben jedoch gezeigt, dass die Verstoffwechselung (Blanford und Murphy 1977) und die plazentare Retention von synthetischen Glukokortikoiden wie Betamethason und Dexamethason sehr gering sind (Dancis et al. 1980). Eine andere in vitro Studie konnte einen höheren Metabolismus von Betamethason in der perfundierten menschlichen Plazenta beobachten (Levitz et al. 1978). In dieser Studie lag Betamethason jedoch fast komplett ungebunden vor. In vivo dagegen ist Betamethason hauptsächlich an Albumin gebunden und der plazentare Transport hängt von der Albuminkonzentration ab (Dancis et al. 1980). Der bessere plazentare Transfer von Betamethason im Gegensatz zu mütterlichem Kortisol spiegelt wohl eine Kombination aus einer verminderten Plasma-Protein-Bindung und einer geringeren Verstoffwechselung durch die 11 $\beta$ -HSD 2 wider.

Das geringfügig verzögerte Auftreten von Betamethason in der fetalen Zirkulation (6.1.4.) ist möglicherweise durch einen initial limitierten plazentaren Transfer aufgrund von "Effluxtransportern" wie dem P-Glykoprotein und Multidrug Resistance (MDR-) assoziierten Proteinen (Young et al. 2003) verschuldet.

Die Plazenta enthält eine Fülle von Transportern, die den sich entwickelnden Fetus vor schädlichen Stoffen schützen und von denen einige spezifisch dazu dienen Xenobiotika und toxische endogene Substanzen zu entfernen. Synthetische Glukokortikoide stellen gute Substrate für den MDR-Gentransporter P-Glykoprotein dar (Yates et al. 2003). Das P-Glykoprotein wird beim Menschen und bei Nagetieren besonders auf plazentaren Trophoblastzellen exprimiert (Croop et al. 1989, Cordon-Cardo et al. 1990), aber auch in vielen anderen Geweben wie auf Endothelzellen, die die Blut-Hirn-Schranke darstellen (Cordon-Cardo et al. 1989).

Beim Adulten konnte gezeigt werden, dass die in vivo Penetration von Dexamethason in das Gehirn bei Knockout-Mäusen mit einem genetischen Defekt im MDR-1a Gen, die damit kein P-Glykoprotein besitzen, um das Fünffache erhöht wird (Meijer et al. 1998). Allerdings ist die Bluthirnschrankengängigkeit im sich entwickelnden Gehirn deutlich besser als im adulten Gehirn (Risau und Wolburg 1990). Das P-Glykoprotein limitiert die freie Diffusion und Bewegung von synthetischen und körpereigenen Glukokortikoiden in die Zelle hinein und aus der Zelle heraus. Auch Kortisol hat eine Affinität zum P-Glykoprotein, jedoch werden Betamethason und Dexamethason im Vergleich zu Kortisol bevorzugt transportiert (Yates et al. 2003).

Einen weiteren Gesichtspunkt, den es zu beachten gilt, stellt der MDR-1 Polymorphismus dar, der mit einer veränderter Expression von P-Glykoprotein in der humanen Plazenta einhergeht (Hitzl et al. 2004). Wenn Mutter und Fetus homozygot für das 3435T-Allel sind oder wenn die Mutter Polymorphismen im 3435T und 2677T-Allel trägt, ist die P-Glykoproteinexpression erniedrigt (Hitzl et al. 2004). Dies bedingt einen stärkeren unkontrollierten plazentaren Übertritt von Substanzen, inklusive synthetischen Glukokortikoiden, und kann durch höhere Plasmakonzentrationen möglicherweise zu einer verstärkten Hirndurchblutungssenkung führen. Die Indikation für eine pränatale Betamethasonbehandlung bei Schwangeren mit einem MDR 1 Polymorphismus sollte deshalb besonders vorsichtig abgewogen werden. Eventuell ist eine Dosisreduktion erforderlich.

### 6.1.6. Plazentare Tier-Mensch-Unterschiede

Es bestehen außerdem deutliche plazentare Unterschiede zwischen humaner und Schafplazenta. Das Schaf weist eine sogenannte Placenta cotyledonaria (Placenta multiplex) auf. Dabei werden im Uterus etwa 100 Karunkeln angelegt, die sich in der Gravidität nach Vereinigung mit den Kotelydonen zu napfförmigen Plazentomen ausbilden (Rüsse und Sinowatz 1991). Die menschliche Plazenta ist dagegen von scheibenförmiger Gestalt (Plazenta discoidalis) und wird makroskopisch durch Plazentarsepten in 15-20 höckerige Felder, die Kotelydonen, eingeteilt (Stauber und Weyerstahl 2001). Da das mütterliche Blut zwischen den Chorionzotten, im sogenannten intervillösen Raum, fließt und nur durch eine dünne synzytiokapillare Stoffwechselmembran vom Fetalkreislauf getrennt ist, wird die Plazenta des Menschen auch als Plazenta haemochorialis bezeichnet. Beim Schaf sind die maternalen und fetalen Gefäße durch vollständiges Endometrium und Chorion voneinander getrennt (Plazenta epitheliochorialis). Da die Diffusionsstrecke zwischen mütterlichem und fetalem Blut beim Menschen deutlich geringer als beim Schaf ist, ist es möglich, dass der Übertritt von Betamethason durch die Plazentarschranke beim Schaf zwar limitiert wird, beim Menschen dagegen eine größere Menge in den fetalen Kreislauf gelangen kann. Dies sollte bei der Übertragung von tierexperimentell gewonnenen Ergebnissen auf den menschlichen Fetus in utero beachtet werden.

### 6.1.7. Die Mikrosphärenmethode

Die Referenzprobenmethode zur Messung der absoluten Hirn- und Organdurchblutung mit Hilfe von Mikrosphären wird seit vielen Jahren beim chronisch instrumentierten Schaffeten angewendet (Rudolph und Heymann 1967). Die ursprünglichen Untersuchungen wurden mit radioaktiv markierten Mikrosphären durchgeführt, doch im Laufe der Zeit wurden alternative Methoden mit Farb- (Kowallik et al. 1991, Hakkinen et al. 1995) und Fluoreszenzmikrosphären (Hale et al. 1986, Jasper et al. 1990) entwickelt. Die Methode zur Aufarbeitung der fluoreszierenden Mikrosphären mittels eines Filters wurde von Glenny et al. 1993 erstmals vorgestellt und bietet eine sehr gute Korrelation im Vergleich zur radioaktiven Standardmethode [ $r=0,95-0,99$ ] (Glenny et al. 1993). Darüberhinaus scheinen fluoreszierende Mikrosphären

den radioaktiv markierten in Langzeitexperimenten überlegen zu sein (Van Oosterhout et al. 1998). Radioaktive Marker lösen sich nach längerer Verweildauer ab und reichern sich selektiv in bestimmten Geweben an, so dass es zur Über- und Unterschätzung der realen Durchblutungswerte kommen kann. Intramethodische mittlere Differenzen und Varianten ergaben sich bei fluoreszierenden Mikrosphären dagegen nicht (Van Oosterhout et al. 1998).

Die Aufarbeitung der Mikrosphären ist kompliziert und vor allem zeit- und kostenaufwendig. Aufgrund der zahlreichen Verarbeitungsschritte und der relativ geringen Tieranzahl, sind zahlreiche systematische Fehler möglich. Die Präzision, mit der die Durchblutung gemessen werden kann, ist abhängig von der Anzahl der Mikrosphären im Gewebe und in der Referenzprobe. Die von uns infundierte Menge von 1 bis 2 Millionen Mikrosphären genügte, um eine ausreichende Anzahl Mikrosphären auch in kleinen Gewebeproben (> 400) sicherzustellen und den systematischen Fehler auf ca. 10% im 95.Konfidenzintervall zu begrenzen (Buckberg et al. 1971).

Während der Mikrosphärenapplikation wurden keine kardiovaskulären Nebenwirkungen durch einen embolischen Verschluss des Kapillarbettes sichtbar. Unterschiede in der hemispheriellen Durchblutung infolge der Katheterisierung der fetalen A. carotis communis konnten nicht nachgewiesen werden (Moon et al. 2000). Auch die Perfusionsfixierung hat keinen Einfluß auf die Ergebnisse der Mikrosphärenmethode (eigene Beobachtung), erleichterte jedoch die Präparation der Hirngewebsproben. Mit der Bestimmung der fetalen Blutgase vor jeder Mikrosphärenapplikation wurden vergleichbare Ausgangsbedingungen auch bezüglich der Hirndurchblutung dokumentiert. Die für die Referenzblutproben entnommene Blutmenge wurde durch mütterliches arterielles Blut ersetzt, um einen Volumenmangel beim Fetus zu vermeiden. Eine Kreuzreaktivität aufgrund verschiedener Blutgruppen ist beim Schaf wesentlich schwächer ausgeprägt als beim Menschen und wurde in keinem Falle beobachtet.



## **6.2. Diskussion der Ergebnisse**

### **6.2.1. Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die fetale Hirndurchblutung bei unterschiedlichen Gestationsaltern**

Bei kontinuierlicher fetaler Betamethasondirektinfusion konnte in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ein Abfall der Hirndurchblutung beim fetalen Schaf um bis zu 40% gemessen werden (Schwab et al. 2000, Löhle et al. 2005). Sowohl zum Zeitpunkt 0,73, als auch zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation, entsprechend der 29. bzw. 34.SSW, führt die fetale Gabe zu einer Senkung der fetalen Hirndurchblutung. Im Rahmen der Versuche zur Asphyxie (0,85 der Gestation) konnte in der vorliegenden Arbeit 24 Stunden nach Beginn der Betamethasoninfusion, und damit vor den Nabelschnurokklusionen, ebenso ein Abfall der fetalen Hirndurchblutung nachgewiesen werden (5.3.2.).

Unabhängig vom Alter des Feten und der Reifung des zerebrovaskulären Systems und der HHN-Achse, schien damit eine antenatale Glukokortikoidbehandlung - neben der Senkung der Mortalität, des RDS und intraventrikulärer Hämorrhagien - mit negativen Wirkungen für den Fetus in utero verbunden zu sein. Deshalb wollten wir herausfinden, ob auch die in der Klinik übliche intramuskuläre maternale Glukokortikoidgabe zu einer Senkung der fetalen Hirndurchblutung führt oder ob durch Passage der Plazenta andere Konzentrationsmuster und damit verbunden Wirkungsänderungen auftreten.

Bei Messung der fetalen Hirndurchblutung nach maternalen Glukokortikoidgabe konnten wir weder zum Zeitpunkt 0,73 noch zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation einen Einfluss feststellen (5.1.). Unsere Hirndurchblutungsmessung fand 3 Stunden nach der mütterlichen Gabe statt, da die Höchstkonzentrationen von Betamethason im fetalen Plasma nach 2 bis 4 Stunden erreicht werden (Schwab et al. 2006, in Druck). Unsere Arbeitsgruppe konnte nach 6 Stunden einen Einfluss der mütterlichen Betamethasongabe auf das Elektrokortikogramm (ECoG) nachweisen (Schmidt et al. 2002). 2 Stunden nach der Gabe fand sich noch kein Effekt, 18 Stunden später ließ sich der Effekt nicht mehr feststellen. Dies ist gut mit dem Wirkmechanismus der Glukokortikoide vereinbar, die über intrazelluläre Rezeptoren die Genexpression verändern. Wir vermuten, dass die für die Änderung der Proteinexpression notwendige Zeit mit dem ersten Auftreten von ECoG-Veränderungen nach 6 Stunden übereinstimmt. Möglicherweise war damit unsere Messung der fetalen Hirndurchblutung 3 Stunden nach der

Betamethasongabe zum Nachweis eines Effektes zu früh. Die Messung 24 Stunden nach mütterlicher intramuskulärer Betamethasonapplikation könnte wiederum zu spät gewesen sein, bedenkt man, dass nach 18 Stunden auch kein Effekt mehr auf das ECoG nachweisbar war. Letzteres erklärt auch die Ergebnisse von Doppler Untersuchungen an menschlichen Feten, bei denen weder 24 und 72 Stunden (Cohlen et al. 1996) bzw. 48 und 96 Stunden (Rotmensch et al. 1999) nach der zweiten Betamethasondosis hämodynamische Veränderungen der Flussgeschwindigkeiten und Wellenformen der Hirnarterien belegt werden konnten.

Die Annahme, dass unsere Messung der fetalen Hirndurchblutung 3 Stunden nach der mütterlichen intramuskulären Betamethasongabe zum Nachweis eines Effektes zu früh war, wird durch die Ergebnisse der Untersuchungen zur Abhängigkeit der Betamethasonwirkung auf die Hirndurchblutungsmessung von den Schlafstadien gestützt, bei denen wir ein Absinken der fetalen Hirndurchblutung sowohl 4 Stunden als auch 4,5 Stunden nach der zweiten intramuskulären Injektion fanden (5.2.). Der Abfall erfolgte im REM- und im NREM-Schlaf, d.h. schlafstadienunabhängig. Es fand sich eine durchschnittliche Hirndurchblutungssenkung von 35-40% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Damit scheint die Senkung der fetalen Hirndurchblutung nach intramuskulärer Betamethasongabe nur relativ kurzfristig, aber genauso stark ausgeprägt wie nach direkter fetaler Infusion zu sein. Untersuchungen zu weiteren Zeitpunkten z.B. 6 und 12 Stunden nach Betamethasongabe sind notwendig. Die Glukokortikoidwirkung war wie bei intravenöser Gabe (Löhle et al. 2005) nach maternaler Gabe unabhängig vom Gestationsalter und somit vom physiologischen Kortisolanstieg und der damit verbundenen Reifung der Stressachse.

#### **6.2.2. Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die fetale Hirndurchblutung in Abhängigkeit von den Schlafstadien**

Wie seit langem bekannt ist, verändert sich auch beim Fetus in utero die Durchblutung in den einzelnen Organen in Abhängigkeit von den Schlafstadien (Jensen et al. 1986). Für das Gehirn im Speziellen wiesen Abrams et al. beim fetalen Schaf mittels Thermodilution einen konvektiven Wärmeverlust, und damit einen Anstieg der Hirndurchblutung, im REM-Schlaf nach (Abrams et al. 1990). Dieses Phänomen konnte mit radioaktiv markierten Mikrosphären (Richardson et al. 1994), sowie mittels Ultraschallproben im Sinus sagittalis

superior (Silvani et al. 2004) beim fetalen Schaf reproduziert werden. Auch bei unseren Experimenten mit fluoreszierenden Mikrosphären waren die verhaltensabhängigen Fluktuationen der fetalen Hirndurchblutung in der Kontrollgruppe nachvollziehbar (5.2.2.). Die schlafstadienabhängigen Schwankungen der Hirndurchblutung beruhen wahrscheinlich auf einer Kopplung zwischen Metabolismus und Durchblutung und spiegeln den hohen Aktivitätszustand des Gehirns im REM-Schlaf wieder (Iadecola 1993).

Nach einem Betamethasonzyklus bestehend aus zwei intramuskulären Injektionen wurde die fetale Hirndurchblutung sowohl im REM- als auch im NREM-Schlaf vermindert. Damit ließen sich auch die schlafstadienabhängigen Schwankungen der fetalen Hirndurchblutung nicht mehr auffinden. Der physiologische Anstieg bzw. Abfall der Hirndurchblutung im REM- und NREM-Schlaf war vier Stunden nach der zweiten Betamethasoninjektion nicht mehr nachweisbar (5.2.3.). Der Effekt ist jedoch wahrscheinlich nur transient, da sich 24 Stunden nach der i.m. Injektion keine Hirndurchblutungssenkung mehr nachweisen ließ (5.1.). Wir vermuten, dass Betamethasoneffekte auf die fetale Hirndurchblutung nur in einem relativ engen Zeitfenster nach intramuskulärer Gabe auftreten (6.2.1.). Die funktionellen Konsequenzen der Unterdrückung des Hirndurchblutungsanstieges für die Schlafstadien sind ebenso wie die deren genaue Funktion bislang unklar.

Zuallererst wird das Ansteigen der Hirndurchblutung im REM-Schlaf wohl den steigenden Substratanforderungen gerecht. Die Erhaltung der elektrokortikalen Aktivität ist ein energieaufwändiger Prozess. Um den Energiebedarf der Ionenpumpen, die den Ionengradienten über die Zellmembran aufrechterhalten, zu decken, ist ungefähr die Hälfte der aus dem zerebralen Glukose- und Sauerstoffmetabolismus gewonnene Energie notwendig (Erecinska und Silver 1989). Der physiologische Hirndurchblutungsanstieg im REM-Schlaf ist mit einer höheren Stoffwechselaktivität des Hirngewebes assoziiert (Madsen et al. 1991). Beim Fetus sind sowohl die Glukose- (Chao et al. 1989) als auch die Sauerstoffaufnahme (Richardson 1992) des Gehirnes im REM- höher als im NREM-Schlaf. Beim fetalen Schaf konnte zudem nachgewiesen werden, dass der zerebrale Leucinmetabolismus zu den Schlafstadien korreliert (Czikk et al. 2003), was darauf hindeutet, dass die Synthese und der Abbau von Proteinen innerhalb des Gehirns schon im Fetus durch die Schlafstadien modifiziert werden. Während im REM-Schlaf vorhandene Ressourcen aufgebraucht

werden, scheinen Syntheseprozesse sowohl beim Fetus (Czikk et al. 2003) als auch im adulten Organismus (Nakanishi et al. 1997, Ramm und Smith 1990) eher mit dem Auftreten von NREM-Schlaf zu korrelieren. Das Absinken des zerebralen Stoffwechsels im NREM-Schlaf, wie es beim Schaffetus (Richardson 1992) und bei anderen Spezies inklusive dem Menschen (Madsen et al. 1991) postnatal gesehen wurde, scheint mit einem Ansteigen der Biosyntheseaktivität einherzugehen. Dies geht Hand in Hand mit der Schlaftheorie von Adam, der davon ausgeht, dass die Energieaufbewahrung im NREM-Schlaf den anabolen Aufbau von Geweben fördert (Adam 1980).

Beim Adulten ist bekannt, dass die Aktivierung des Gehirns mit der HHN-Achse gekoppelt ist. Eine Adrenalectomie bei adulten Ratten führt zu Veränderungen der Schlafarchitektur (Bradbury et al. 1998). Glukokortikoide bewirken bei Erwachsenen eine Inzidenzabnahme von REM- und einen Inzidenzanstieg von NREM-Schlaf (Born et al. 1991, Bohlhalter et al. 1997). Vigilanzschwankungen, die mit einer Veränderung der Betaaktivität im Elektroenzephalogramm einhergehen, werden mit der physiologischen zirkadianen Rhythmik des Kortisolspiegels in Verbindung gebracht (Chapotot et al. 1998).

Die Verminderung der fetalen Hirndurchblutung nach Betamethasongabe sowohl im REM- als auch im NREM-Schlaf lassen jedoch einen schlafstadienspezifischen Glukokortikoideffekt unwahrscheinlich erscheinen, so dass wir eher einen von der Hirnfunktion und vom zerebralen Metabolismus unabhängigen Effekt annehmen. Ein unspezifischer Einfluss auf den zerebralen Gefäßtonus ist damit wahrscheinlicher als eine Wirkung über eine Kopplung zwischen Metabolismus und Durchblutung.

### **6.2.3. Ursachen der fetalen Hirndurchblutungssenkung**

Die Ursachen der festgestellten fetalen Hirndurchblutungssenkung beruhen hauptsächlich auf einer Zunahme des zerebrovaskulären Widerstandes (Schwab et al. 2000, Löhle et al. 2005). Diese Zunahme des zerebrovaskulären Widerstandes ist, wie Untersuchungen unserer eigenen Arbeitsgruppe belegen, wahrscheinlich durch die Hemmung der Cyclooxygenase 2 (COX-2) und der endothelialen und induzierbaren Nitritoxidsynthetase (eNOS und iNOS) bedingt, den wichtigsten vasodilatatorisch wirksamen Mediatoren in der fetalen zerebralen Zirkulation (Wood et al. 2003). So konnte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) auf dem mRNA-Level sowie immunhistochemisch auf dem Proteinlevel an 128 Tage alten Schaffeten, die

12mg Betamethason erhalten hatten, gezeigt werden, dass COX-2 und eNOS und iNOS, nicht jedoch die neuronale NOS (nNOS) gehemmt werden (Wood et al. 2003).

Die COX-2, eine induzierbare Isoform im Endothel der Hirngefäße (Peri et al. 1995, Li et al. 1997), stellt die Hauptform der Cyclooxygenasen im fetalen Gehirn dar. Im adulten Gehirn dagegen wird sie nur unter Stimulationsbedingungen, wie beispielsweise einer Entzündungsreaktion, exprimiert (Crofford 1997). Ein weiterer Unterschied zum adulten Gehirn ist, dass im Fetus Prostaglandine hauptsächlich vasodilatatorische Effekte haben (Peri et al. 1995) und die zerebrale Autoregulationskapazität beeinflussen (Chemtob et al. 1990). In der zerebralen Zirkulation des neonatalen Gehirns bewirkt PGF-2 $\alpha$  nur eine minimale Vasokonstriktion und PGE-2 eine Vasodilation (Hayashi et al. 1985, Leffler 1997). Diese Besonderheit ist auf eine verminderte Dichte an PGE-2 und PGF-2 $\alpha$  Rezeptoren in den Hirngefäßen und eine verminderte Aktivierung rezeptorgekoppelter Second Messenger während einer zerebralen Vasokonstriktion zurückzuführen (Li et al. 1994).

Die Regulierung des zerebralen Tonus wird desweiteren von der NOS bestimmt, deren Reifung mit der zerebralen Durchblutung parallel läuft (Northington et al. 1996). NO, oder Endothelium Derived Relaxing Factor, bewirkt als Neurotransmitter eine Vasodilatation von Gefäßen. Glukokortikoide können die NOS direkt (Wallerath et al. 1999, Whitworth et al. 2002), über die Hemmung eines Co-Faktors der NOS (Johns 2001) oder indirekt über das PG-System hemmen. Man unterscheidet eNOS, nNOS und iNOS, deren Regulation durch PGE<sub>2</sub> über EP<sub>3</sub>-Rezeptoren bei neugeborenen Ferkeln erfolgt (Dumont et al. 1998, Dumont et al. 1999). Die Infusion von L-NAME, einem Inhibitor der Endothelium-derived NO-Synthese, führt zu einem signifikanten Anstieg des arteriellen Blutdruckes und einem Absinken der kortikalen Hirndurchblutung (Prado et al. 1992).

Andererseits kommen auch katabole Glukokortikoideffekte auf den zerebralen Stoffwechsel als weitere Ursache für die zerebrale Vasokonstriktion in Betracht. Die zerebrale Perfusion ist eng an den zerebralen Stoffwechselbedarf gekoppelt (Iadecola 1993). Im adulten Rattenhirn führte eine Adrenalectomie zu einer erhöhten Glukoseutilisation im gesamten Gehirn, besonders aber im limbischen System (Kadekaro et al. 1988, Doyle et al. 1994a). Auch nach Gabe von Kortikosteron ließen sich bei adulten Ratten Effekte auf den lokalen Verbrauch

von 2-desoxy-Glukose in Hippocampus, Septum, Thalamus und Hypothalamus beobachten (Doyle et al. 1994b). Tatsächlich ließ sich eine Hemmung der Cytochrom-C-Oxidase beim fetalen Schaf zum Zeitpunkt 0,8 der Gestation nachweisen (Schwab et al. 2005), so dass weitergehend davon ausgegangen werden kann, dass Glukokortikoide eine wichtige, allgemein katabole Rolle in der Regulierung des zerebralen Stoffwechsels spielen. Über die Kopplung von Metabolismus und Durchblutung kommt es möglicherweise zu einer sekundären Hirndurchblutungssenkung, die damit physiologisch aufgrund eines verminderten Metabolismus auftreten würde. Eine Entkopplung von Stoffwechsel und Durchblutung mit möglicherweise negativen Folgen für das Gehirn scheint aber nicht stattzufinden. Insgesamt vermuten wir weniger einen stoffwechselbedingten Betamethasoneinfluss als vielmehr einen unspezifischen vasokonstriktiven Effekt auf die Hirngefäße (6.2.2.).

#### **6.2.4. Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die fetale Hirndurchblutung unter asphyktischen Bedingungen**

##### **6.2.4.1. Effekte einer Asphyxie auf die fetale Hirndurchblutung**

Von unserer Arbeitsgruppe wurden die dynamischen Hirndurchblutungsänderungen während einer Asphyxie mittels Laser Doppler Flowmetry untersucht. Dabei führte zum Zeitpunkt 0,85 der Gestation eine viermalige vierminütige Nabelschnurokklusion jeweils im Abstand von 26 Minuten zunächst zu einem Abfall der kortikalen Hirndurchblutung um  $56 \pm 5\%$  sowie zu einem Anstieg der Durchblutung im Subkortex auf bis zu  $179 \pm 13\%$  (Müller et al. 2006). Das bedeutet, dass es während einer Asphyxie zu einer Umverteilung des Blutes vom Kortex zum Subkortex kommt (Müller et al. 2006) und bestätigt damit frühere Messungen von Jensen et al., die durch eine Modifikation der Mikrosphärenmethode im 1-Minuten-Abstand während einer Asphyxie messen konnten und ebenfalls eine Umverteilung des Blutes von kortikalen Arealen in Richtung Hirnstamm feststellten (Jensen et al. 1987). Die Abnahme der kortikalen Durchblutung wird wahrscheinlich durch eine verstärkte Aktivierung der arteriellen Chemorezeptoren bewirkt, die via Sympathikus zu einer reflektorischen zerebralen Vasokonstriktion führt (Jensen et al. 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte unmittelbar nach den Nabelschnurokklusionen mit Hilfe fluoreszierender Mikrosphären ein Anstieg der fetalen Hirndurchblutung auf durchschnittlich  $154 \pm 19\%$  gezeigt werden.

Besonders ausgeprägt war der Anstieg im Hirnstamm auf  $192 \pm 32\%$ . Dies stimmt ebenfalls mit den Ergebnissen von anderen Autoren überein. So bestimmten beispielsweise Kaneko et al. 2 Minuten und 3,5 Minuten nach einer vierminütigen Nabelschnurokklusion einen Anstieg der fetalen Hirndurchblutung mit Hilfe von Mikrosphären (Kaneko et al. 2003). Auch in dieser Studie war der Anstieg besonders im Hirnstamm sichtbar. Allerdings kam es zu einer 2,5 bis 2,8fachen Erhöhung der Durchblutung. Der etwas geringere Anstieg in der vorliegenden Arbeit mag mit einer Abschwächung der zerebrovaskulären postasphyktischen Hyperperfusion nach einer repetitiven Nabelschnurokklusionen erklärbar sein. Die erhöhte Hirndurchblutung in der frühen Phase der Reperfusion lässt sich durch eine Vasodilatation des zerebralen Gefäßbettes auf Grund des erniedrigten Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruckes erklären (Johannsson und Siesjö 1975). Durch einen Verlust der Autoregulation aufgrund des Sauerstoffmangels kommt es durch den überschießenden Anstieg des arteriellen Blutdruckes ebenfalls zu einer Erweiterung der zerebralen Gefäße (Jensen et al. 1999). Als weitere Ursachen werden eine zerebrale Gewebeazidose mit nachfolgender Vasodilatation und eine Reduktion der Blutviskosität bei ansteigender Flußgeschwindigkeit diskutiert (Takagi et al. 1977).

Auf die initiale Hyperperfusion des Gehirns folgt unmittelbar ein Abfall auf die Ausgangswerte wie in der vorliegenden Arbeit anhand des Abfall der fetalen Hirndurchblutung auf die Ausgangswerte zwei Stunden nach der Asphyxie gezeigt werden konnte (5.3.3.). Grund ist vermutlich eine verminderte Vasodilatation durch einen Anstieg des Kohlendioxidpartialdruckes des zerebralen Gefäßbettes (Rosenberg et al. 1989, Berger et al. 1996). Hieraus resultiert eine Vasokonstriktion mit einer Entkoppelung von Durchblutung und metabolischer Aktivität (Hossmann 1993). Möglicherweise ist die Verminderung der Perfusion auch durch Sauerstoffradikale bedingt, die in der Rezirkulationsphase nach der Ischämie entstehen. So konnte die Arbeitsgruppe um Rosenberg zeigen, dass dieses Phänomen durch eine Suppression der Sauerstoffradikalproduktion nach Ischämie verhindert werden konnte (Rosenberg et al. 1989). Während einer zerebralen Ischämie werden aufgrund einer verminderten oxidativen Phosphorylierung energiereiche Phosphate rasch abgebaut. Innerhalb von wenigen Minuten akkumulieren somit Adenosin und Hypoxanthin, bei deren Abbau erhebliche Mengen an Sauerstoffradikalen

gebildet werden (McCord 1985). Diese bewirken während der Reperfusionsphase, zusammen mit exzitatorischen Aminosäuren wie Glutamat, einen sekundären Zellschaden (Übersicht in Berger und Garnier 1998).

Es fand sich 24 Stunden nach der Asphyxie eine sekundäre postasphyktische Hyperperfusion auf ungefähr das Doppelte der Ausgangswerte (5.3.3.). Diese im Anschluss an die Hypoperfusion mit einer Latenzphase folgende starke Hyperperfusion ist beim fetalen Schaf nach schwerer Asphyxie typisch (Jensen und Berger 1991, Marks et al 1996b, Raad et al. 1999). Sie ist oft mit einem isoelektrischen Enzephalogramm assoziiert und damit ein ungünstiger Faktor (Pryds et al. 1990). Die sekundäre Vasodilatation ist möglicherweise durch eine Erhöhung der NO-Produktion mitbedingt. Durch Gabe von L-NNA, einem kompetitiven Antagonisten der NO-Produktion, konnte sie abgeschwächt werden (Marks et al. 1996a).

#### **6.2.4.2. Glukokortikoideffekte auf die fetale Hirndurchblutung nach einer Asphyxie**

Nach einer Asphyxie vermindert Betamethason die späte, nicht jedoch die frühe postasphyktische Hyperperfusion (5.3.4.). Dies ist möglicherweise auf die direkten vasokonstriktorischen Betamethasoneffekte zurückzuführen. Als Ursache der sekundären Durchblutungsminderung kommt auch der katabole Einfluss von Betamethason auf den zerebralen Stoffwechsel in Betracht (6.2.4.3.).

Während der Asphyxie führte die Betamethasonbehandlung zu keinem verstärkten Abfall der kortikalen Hirndurchblutung (Müller et al. 2006). Jedoch fand sich in der Betamethasongruppe ein geringerer gegenregulatorischer Anstieg der Durchblutung im Subkortex als in der Kontrollgruppe, was auf eine verminderte Umverteilung des Blutes von kortikalen zu subkortikalen Gebieten schließen lässt (Müller et al. 2006). Die nach einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auftretende 50%ige Abnahme der periventrikulären Leukomalazie (Canterino et al. 2001) lässt sich durch die verminderte Umverteilung der zerebralen Durchblutung nicht erklären. Die Hemmung der späten postasphyktischen Hyperperfusion nach Betamethasongabe könnte jedoch zu einer geringeren Bildung von Sauerstoffradikalen führen, die für den sekundären Zellschaden in der späten Phase der Reperfusion mitverantwortlich gemacht werden (Bagenholm et al. 1998).



Die Funktion der postasphyktischen Hyperperfusion wird jedoch kontrovers diskutiert. In einer Studie am fetalen Schaf wurde auch ein neuroprotektiver Effekt der sekundären Reperfusion beschrieben (Raad et al. 1999). Ebenfalls beim fetalen Schaf führte eine Abschwächung der Hyperperfusion mit einem NO-Inhibitor zu einer Exazerbation des neuronalen Zelltodes (Marks et al. 1996a). Bei unseren Experimenten, also im reifen Fetalgehirn, findet sich nach Betamethasongabe eine erhöhte Vulnerabilität von besonders Hippokampus und parasagittalem Kortex gegenüber einer Asphyxie (Antonow-Schlorke et al. 2003b). Viele Autoren sehen die postasphyktische Hyperperfusion jedoch eher negativ, da sie meist mit ECoG-Veränderungen einhergeht (Pryds et al. 1990, Tan et al. 1992). Die Kombination aus isoelektrischem Elektroenzephalogramm und zerebraler Hyperperfusion gilt bei Neugeborenen als früher Indikator für einen schweren Hirnschaden (Pryds et al. 1990). Als mögliche Ursache für den verstärkten selektiven postasphyktischen neuronalen Untergang im Hippokampus und im Kortex bei unseren Versuchen kommen wohl ebenso direkte neurotoxische Betamethasoneffekte in Betracht (2.5.2.).

Der klinisch nachgewiesene glukokortikoidbedingte Schutz vor intraventrikulären Blutungen (Ment et al. 1995), ist möglicherweise durch eine glukokortikoidbedingte Verschiebung der oberen Grenze der zerebralen Autoregulationsgrenzen hin zu höheren Blutdruckwerten zu erklären, da der erhöhte zerebrale Gefäßtonus Blutdruckspitzen und damit Gefäßrupturen mit nachfolgenden hypertensiven Blutungen entgegenwirkt (Müller et al. 2002). Eine Abnahme der postasphyktischen Hyperperfusion stellt vermutlich ebenfalls einen protektiven Effekt gegenüber intraventrikulären Blutungen dar.

#### **6.2.4.3. Glukokortikoideffekte auf den zerebralen Stoffwechsel unter asphyktischen Bedingungen**

Beim Feten steht während einer Asphyxie der Substratmangel gegenüber dem Sauerstoffmangel im Vordergrund (Rosenberg und Murdaugh 1990). Wenn der Fetus seinen Energiebedarf auch über die anaerobe Glykolyse nicht mehr decken kann kommt es zum Erliegen der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe. Dies bewirkt einen „Kalzium-Overload“, der wiederum durch die Aktivierung von Proteasen, Lipasen und Endonukleasen zu messbaren neuronalen Zelluntergängen führt (Berger und Garnier 1998). Eine Hypoxie-Ischämie führt neben einer Entleerung der Energiereserven, zu einer Bildung reaktiver Sauerstoffradikale,

oxidativem Stress, Azidose und einer Glutamat-Exzitotoxizität, die Zelltod, Apoptose und Entzündung nach sich ziehen (Vannucci und Hagberg 2004).

Im Rahmen einer Hypoxie kommt es auch zum Anstieg der Plasmakonzentrationen von Stresshormonen, wie Katecholaminen (Bachelard et al. 1974). Sie sind auch nach der Geburt, besonders bei Neugeborenen mit niedrigen Apgar-Scores (unter 7min nach 5min) oder mit einer Azidose (pH-Wert im arteriellen Nabelschnurblut unter 7,25) erhöht (Greenough et al. 1987). Katecholamine führen durch einen erhöhten Abbau der Glykogenspeicher zu einem initialen Ansteigen der Blutglukosekonzentration im Blut. Dauert die Hypoxie jedoch länger an, kommt es zu einem Abfall des Blutglukosespiegels, wahrscheinlich durch einen PGE-2 vermittelten Antagonismus der katecholaminergen Glykogenolyse (Hooper 1995). Dies ließ sich bei unseren Untersuchungen nicht nachweisen. Die Glukosespiegel zeigten in der Kontrollgruppe weder 2 Minuten, noch 2 oder 24 Stunden nach der Asphyxie eine Veränderung. Die Blutgase und der pH-Wert erholten sich relativ rasch und im Vergleich zu den Ausgangswerten ließen sich bereits zwei Stunden nach der repetitiven Nabelschnurokklusion keine Veränderungen mehr feststellen. Einzig ein verzögerter Abbau des Laktatanstieges war noch nachzuweisen. Dieser war unter Betamethason besonders ausgeprägt und hatte sich auch 24 Stunden nach der Asphyxie noch nicht vollständig zurückgebildet. In der Betamethasongruppe ließ sich ebenso eine erhöhte Glukosekonzentration, sowohl 2 Stunden als auch 24 Stunden nach der Asphyxie, messen.

Dies bedeutet, dass eine Betamethasongabe zu einem erhöhten Substratangebot und zu einer verstärkten anaeroben Glykolyse als Antwort auf den Sauerstoffmangel führt, was mit einer erhöhten Laktatakkumulation einhergeht. Der im Normalbereich liegende pH-Wert lässt sich möglicherweise durch eine Abpufferung des Laktats über intrazelluläre Mechanismen erklären. Sekundär bleibt durch die Aufrechterhaltung der Glykolyse das zerebrale ATP erhalten, so dass Glukokortikoide einen gewissen Schutz gegenüber hypoxisch-ischämischen Hirnschäden darstellen (Tuor et al. 1997). In einer Studie an Ratten verzögerte sich der Abbau der Reserven an Hochenergiephosphaten wie ATP und Phosphokreatinin nach einer Hypoxie unter Glukokortikoidgabe (Tuor et al. 1997). Erhöhte Blutglukosespiegel verringern den Hirnschaden nach einem ischämischen Insult erheblich (Vannucci et al. 1996). Der neuroprotektive Effekt einer Hyperglykämie scheint jedoch mit zunehmender Ausreifung des

Gehirns ins Gegenteil umzuschlagen und trägt im adulten Rattengehirn zu einer Verstärkung der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung bei (Sapolsky und Pulsinelli 1985).

#### **6.2.4.4. Mechanismen der Glukokortikoideffekte auf Modulatoren des zerebrovaskulären Tonus unter asphyktischen Bedingungen**

Von den vielen Mediatoren, die den zerebralen Gefäßtonus während einer Asphyxie regulieren, sollen hier im Besonderen Stickstoffmonoxid, Prostaglandine und Endothelin-1 herausgestellt werden, weil sie potentiell durch Glukokortikoide beeinflusst werden.

##### Stickstoffmonoxid (NO)

Während einer Asphyxie und in der frühen Phase der Reoxygenation nimmt die NO-Freisetzung aufgrund einer verminderten Aktivität der eNOS deutlich ab (McQuillan et al. 1994). Dies führt auch beim Feten zu einer Abnahme der hypoxisch bedingten Vasodilatation (van Bel et al. 1995) und somit zu einer Verstärkung der funktionellen und morphologischen Hirnschädigung (Marks et al. 1996a). Ursächlich hierfür sind freie Radikale, die während der Hypoxie und der Reperfusion sowohl von der eNOS selbst als auch von der COX und der sich in Endothel- und glatten Muskelzellen befindlichen  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ -Oxidase gebildet werden (Kojda und Harrison 1999). Die NO-Produktion erfolgt sauerstoffabhängig. Da Sauerstoff während der Asphyxie nicht zur Verfügung steht, kann NO erst in der Reperfusionsphase gebildet werden (Beckmann et al. 1992). In der späten Phase der Reperfusion konnte nachgewiesen werden, dass die Gabe von L-NNA, einem kompetitiven Antagonisten der NO-Produktion zu einer Abschwächung der sekundären Hyperperfusion führt (Marks et al. 1996a). Dies impliziert, dass NO Anteil an der Entstehung der postasphyktischen Hyperperfusion hat. Glukokortikoide hemmen die eNOS (Wood C.E. 2003) und vermindern damit die Konzentration von freiem NO. Damit tragen Glukokortikoide möglicherweise auf diesem Wege zur Unterdrückung der späten postasphyktischen Hyperperfusion beim Fetus bei.

##### Prostaglandine

Beim Fetus tragen Prostaglandine zur zerebralen Vasodilatation, und damit zu einer Erhöhung der fetalen Hirndurchblutung, während und nach einer Hypoxie,

bei. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des zerebralen Mikrogefäßtonus (Leffler und Parfenova 1997). Durch Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und Phospholipase A (PLA) kommt es während einer fokalen Ischämie und der darauffolgenden Reperfusion zu einer transienten Induktion der COX-2, besonders in kortikalen Neuronen, die ein vorzugsweise hohes Risiko nach einer zerebralen Ischämie tragen (Miettinen et al. 1997, Domoki et al. 1999). Die gesteigerte Expression der COX-2 geht mit erhöhten PGE-2-Konzentrationen im zerebralen Kortex von Beagles während einer perinatalen Asphyxie einher (Ment et al. 1987). Auch beim fetalen Schaf konnten nach moderater und schwerer Hypoxie gestiegene PGE-2-Konzentrationen gemessen werden (Supramaniam et al. 2004), die einen möglicherweise entscheidenden Anteil an der postasphyktischen Hyperperfusion haben.

Glukokortikoide hemmen die PGE-2-Expression, wie beim neugeborenen Schwein festgestellt wurde (Wagerle et al. 1991) und die Expression der COX-2 im Hirnstamm, im zerebralen Kortex und im Hippokampus (Figuerola et al. 1999, Wood C.E. 2003). Auch in vitro Untersuchungen am isolierten hämoperfundierten bovinen Uterus konnten nachweisen, dass Dexamethason zu einem Abfall der PGE<sub>2</sub>-Produktion führt (Braun und Kietzmann 2004). Dies ist mit niedrigen Prostaglandinkonzentrationen verbunden, die beim neugeborenen Schwein zu einer Upregulation von Prostaglandinrezeptoren und eine Zunahme ihrer Dichte in kleinen zerebralen Gefäßen führen (Li et al. 1995, Chemtob et al. 1996), was eine erhöhte Sensibilität bewirkt.

Die Hemmung des vasodilatativ wirkenden PGE-2 ist ein möglicher Mechanismus für die Unterdrückung der späten postasphyktischen Hyperperfusion.

#### Endothelin-1 (ET-1)

Als bedeutender Vasokonstriktor spielt ET-1 eine wesentliche Rolle für den basalen Gefäßtonus im adulten Organismus (Rubanyi und Botelho 1991). ET-1 führt zu einer Steigerung des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms in die Zelle, einer Aktivierung von Proteinkinasen und einer Phosphorylierung von Myosin (Karimova und Pinsky 2001). Während einer fetalen Asphyxie scheint ET-1 auch an der Aufrechterhaltung des fetalen Kreislaufes Anteil zu nehmen (Tsang et al. 2001). Nach intermittierender wiederholter Nabelschnurokklusion bei der Ziege konnte

man eine signifikant erhöhte ET-1-Konzentration gegenüber der Kontrollgruppe nachweisen (Takada et al. 1996). ET-1 kann den placentaren Mikrozirkulationswiderstand stark erhöhen und ist möglicherweise an der Redistribution des Blutflusses während einer Hypoxie beteiligt (Perreault und Coceani 2003).

Bei der adulten Ratte induzieren Glukokortikoide die Freisetzung von ET-1 aus Gefäßmuskelzellen (Kanse et al. 1991) und modulieren die Bindung an ET-1-Rezeptoren (Provencher et al. 1995). Beim fetalen Schaf erhöht eine pränatale Dexamethasonbehandlung die Sensitivität zerebraler Arterien gegenüber ET-1 aufgrund einer gesteigerten Bindung an ET<sub>A</sub>-Rezeptoren (Docherty et al. 2001). Durch Verstärkung des schon durch die Hypoxie erhöhten ET-1-Spiegels bzw. Steigerung der Bindung an ET<sub>A</sub>-Rezeptoren trägt Betamethason wahrscheinlich zum erhöhten zerebrovaskulären Tonus und damit zur Unterdrückung der postasphyktischen Reperfusion bei.

## 7. Schlussfolgerungen

Pränatal verabreichte Glukokortikoide wirken sowohl peripher als auch zerebral vasokonstriktorisches. Eine Zunahme des peripheren Gefäßtonus lässt sich nach fetaler und maternaler Gabe unabhängig vom Gestationsalter nachweisen (Bennet et al. 1999, Schwab et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals nach maternaler Betamethasongabe, wie in der klinischen Praxis üblich, ein ähnlicher Abfall der fetalen Hirndurchblutung nachgewiesen werden, wie nach fetaler Direktinfusion (Schwab et al. 2000, Löhle et al. 2005). Wir vermuten, dass die glukokortikoidbedingte Hirndurchblutungssenkung nur transient ist und zudem erst mit einer Latenz von ungefähr 4 Stunden auftritt. Ursächlich sind möglicherweise die unterschiedlichen Plasmaprofile nach fetaler und maternaler Gabe mit höheren Betamethasonspitzenplasmakonzentrationen nach maternaler Gabe und ein initial limitierter plazentarer Transfer von Betamethason. Weitere Untersuchungen sollten nun darauf ausgerichtet werden, Messungen der fetalen Hirndurchblutung zu weiteren Zeitpunkten, z.B. nach 6 oder 12 Stunden, durchzuführen, um zu bestätigen, dass der zerebrovaskuläre Betamethasoneffekt nur transient ist.

Die hier festgestellte Hemmung der späten postasphyktischen Hyperperfusion durch Betamethason stellt vermutlich einen protektiven Effekt vor intraventrikulären Blutungen dar, die oft fatale Folge einer schweren intrauterinen oder unter der Geburt vorkommenden Asphyxie sind. Möglicherweise schützt die sekundäre Reperfusion im unreifen Gehirn durch die geringere Bildung von Sauerstoffradikalen ebenso vor einer periventrikulären Leukomalazie. Dies würde die Verringerung der Inzidenz einer periventrikulären Leukomalazie unter pränataler Glukokortikoidtherapie erklären. Im reifen Fetalgehirn wurde jedoch in unserer Arbeitsgruppe ein verstärkter, histopathologisch nachweisbarer postasphyktischer Hirnschaden unter Betamethason festgestellt. Studien zu Betamethasoneffekten auf die postasphyktische Hyperperfusion und deren funktionelle und strukturelle Konsequenzen für das fetale Gehirn, besonders nach maternaler Gabe, sollten weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Da wir auch unter asphyktischen Bedingungen nach maternaler Gabe einen Wirkungsverlust von Betamethason entsprechend den ECoG-Veränderungen innerhalb von 24 Stunden erwarten,

führt die maternale Applikation möglicherweise nicht zu einer Hemmung der späten postasphyktischen Hyperperfusion nach 24 Stunden.

Die Referenzprobenmethode stellt beim Fetus nach wie vor die einzige Möglichkeit zur absoluten Durchblutungsmessung in verschiedenen Hirnregionen dar. Sie hat jedoch einige Nachteile. So ist sie nur experimentell durchzuführen, auch sind zahlreiche systematische Fehler aufgrund der zahlreichen Verarbeitungsschritte und der meist relativ geringen Tieranzahl möglich. Die Experimente sind zudem kompliziert und sehr zeit- und kostenaufwendig, so dass eine weiterer Ausbau der Nutzung von Laser-Doppler Untersuchungen sowie anderer, möglicherweise sogar bei menschlichen Feten in vivo nutzbarer Messverfahren eine Erleichterung der Untersuchungen der fetalen zerebrovaskulären Effekte wäre.

Glukokortikoide führen zu einer Reduktion des RDS und verbessern das Outcome der Feten. Aber gerade die Senkung der Hirndurchblutung auch nach klinisch üblichen Dosen führt uns vor Augen, dass eine pränatale Glukokortikoidbehandlung mit Nebenwirkungen behaftet ist, von deren funktionellen Konsequenzen im späteren Leben wir recht wenig wissen. Möglicherweise sollte über eine Dosisreduktion nachgedacht werden, da in Bezug auf die vaskulären Effekte die bisher in der klinischen Praxis verwendeten Dosen als supramaximal für die Lungenreifung angesehen werden. Mehrfachdosen sollten konsequent vermieden werden und nur im Notfall nach sorgfältiger Indikation angewendet werden, da es dadurch nicht zu einer statistischen Verbesserung der neonatalen Sterblichkeit kommt, sondern vor allem die nichtpulmonalen Glukokortikoidwirkungen verstärkt werden.

## 8. Literaturverzeichnis

- Abrams RM, Post JC, Burchfield DJ, Gomez KJ, Hutchison AA, Conlon M. 1990. Local cerebral blood flow is increased in rapid-eye-movement sleep in fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol*, 162 (1):278-281.
- Adam K. 1980. Sleep as a restorative process and a theory to explain why. *Prog Brain Res*, 53:289-305.
- Aghajafari F, Murphy K, Matthews S, Ohlsson A, Amankwah K, Hannah M. 2002. Repeated doses of antenatal corticosteroids in animals: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol*, 186 (4):843-849.
- Allaire AD, Cefalo RC. 1998. Preconceptional health care model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 78 (2):163-168.
- Alonso G. 2000. Prolonged corticosterone treatment of adult rats inhibits the proliferation of oligodendrocyte progenitors present throughout white and gray matter regions of the brain. *Glia*, 31 (3):219-231.
- Antonow-Schlorke I, Schwab M, Li C, Nathanielsz PW. 2003a. Glucocorticoid exposure at the dose used clinically alters cytoskeletal proteins and presynaptic terminals in the fetal baboon brain. *J Physiol*, 547 (Pt 1):117-123.
- Antonow-Schlorke I, Herrmann A, Müller T, Anwar MA, Schubert H, Witte O, Schwab M 2003b. Betamethasone (BM) exposure increases hippocampal neuronal necrosis after repeated umbilical cord occlusion (UCO) in fetal sheep. in 28th Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society. Banff, Canada.
- Anwar MA, Schwab M, Poston L, Nathanielsz PW. 1999. Betamethasone-mediated vascular dysfunction and changes in hematological profile in the ovine fetus. *Am J Physiol*, 276 (4 Pt 2):H1137-1143.
- Anyaegbunam A, Brustman L, Divon M, Langer O. 1986. The significance of antepartum variable decelerations. *Am J Obstet Gynecol*, 155 (4):707-710.
- Asakura H, Ball KT, Power GG. 1990. Interdependence of arterial PO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> consumption in the fetal sheep. *J Dev Physiol*, 13 (4):205-213.
- Aserinsky E, Kleitman N. 1953. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science*, 118 (3062):273-274.
- Ashwal S, Dale PS, Longo LD. 1984. Regional cerebral blood flow: studies in the fetal lamb during hypoxia, hypercapnia, acidosis, and hypotension. *Pediatr Res*, 18 (12):1309-1316.
- Astrom KE. 1967. On the early development of the isocortex in fetal sheep. *Prog Brain Res*, 26:1-59.
- Bachelard HS, Lewis LD, Ponten U, Siesjö BK. 1974. Mechanism activating glycolysis in the rat brain in arterial hypoxia. *J Neurochem*, 22:395-401.
- Bagenholm R, Nilsson UA, Gotborg CW, Kjellmer I. 1998. Free radicals are formed in the brain of fetal sheep during reperfusion after cerebral ischemia. *Pediatr Res*, 43 (2):271-275.
- Ballard PL, Liggins GC. 1982. Glucocorticoid activity in cord serum: comparison of hydrocortisone and betamethasone regimens. *J Pediatr*, 101 (3):468-470.



- Ballard PL, Ballard RA. 1995. Scientific basis and therapeutic regimens for use of antenatal glucocorticoids. *Am J Obstet Gynecol*, 173 (1):254-262.
- Ballard PL, Granberg P, Ballard RA. 1975. Glucocorticoid levels in maternal and cord serum after prenatal betamethasone therapy to prevent respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*, 56 (6):1548-1554.
- Barkovich AJ. 1992. MR and CT evaluation of profound neonatal and infantile asphyxia. *AJNR Am J Neuroradiol*, 13 (3):959-972.
- Barrington KJ. 2001. The adverse neuro-developmental effects of postnatal steroids in the preterm infant: a systematic review of RCTs. *BMC Pediatr* 1(1): 1.
- Beckmann JS, Chen J, Ischiropoulos H, Conger KA. 1992. Inhibition of nitric oxide synthesis and cerebral protection. Krieglstein J, Oberpichler-Schwenk H (Eds), *Pharmacology of cerebral ischemia*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart: 383-394
- Benediktsson R, Calder AA, Edwards CR, Seckl JR. 1997. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 46 (2):161-166.
- Bennet L, Kozuma S, McGarrigle HHG, Hanson MA. 1999. Temporal changes in fetal cardiovascular, behavioural, metabolic and endocrine responses to maternally administered dexamethasone in the late gestation fetal sheep. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 106 (4):331-339.
- Bennet L, Peebles DM, Edwards AD, Rios A, Hanson MA. 1998. The cerebral hemodynamic response to asphyxia and hypoxia in the near-term fetal sheep as measured by near infrared spectroscopy. *Pediatr Res*, 44 (6):951-957.
- Berger R, Garnier Y. 1998 Pathophysiologie perinataler Hirnschäden. *Gynäkologe*, 31:661-679.
- Berger R, Lehmann T, Karcher J, Schachenmayr W, Jensen A. 1996. Relation between cerebral oxygen delivery and neuronal cell damage in fetal sheep near term. *Reprod Fertil Dev*, 8 (3):317-321.
- Berkowitz GS, Papiernik E. 1993. Epidemiology of preterm birth. *Epidemiol Rev*, 15 (2):414-443.
- Bishai JM, Blood AB, Hunter CJ, Longo LD, Power GG. 2003. Fetal lamb cerebral blood flow (CBF) and oxygen tensions during hypoxia: a comparison of laser Doppler and microsphere measurements of CBF. *J Physiol*, 546 (Pt 3):869-878.
- Blanford AT, Murphy BE. 1977. In vitro metabolism of prednisolone, dexamethasone, betamethasone, and cortisol by the human placenta. *Am J Obstet Gynecol*, 127 (3):264-267.
- Boddy K, Dawes GS, Fisher R, Pinter S, Robinson JS. 1974. Foetal respiratory movements, electrocortical and cardiovascular responses to hypoxaemia and hypercapnia in sheep. *J Physiol Lond*, 243 (3):599-618.
- Bohlhalter S, Murck H, Holsboer F, Steiger A. 1997. Cortisol enhances non-REM sleep and growth hormone secretion in elderly subjects. *Neurobiol Aging*, 18 (4):423-429.
- Born J, DeKloet ER, Wenz H, Kern W, Fehm HL. 1991. Gluco- and antimineralocorticoid effects on human sleep: a role of central corticosteroid receptors. *Am J Physiol*, 260 (2 Pt 1):E183-188.

- Bradbury MJ, Dement WC, Edgar DM. 1998. Effects of adrenalectomy and subsequent corticosterone replacement on rat sleep state and EEG power spectra. *Am J Physiol*, 275 (2 Pt 2):R555-565.
- Braun M, Kietzmann M. 2004. Ischaemia-reperfusion injury in the isolated haemoperfused bovine uterus: an in vitro model of acute inflammation. *Altern Lab Anim*, 32 (2):69-77.
- Buckberg GD, Luck JC, Payne DB, Hoffman JI, Archie JP, Fixler DE. 1971. Some sources of error in measuring regional blood flow with radioactive microspheres. *J Appl Physiol*, 31 (4):598-604.
- Burton PJ, Waddell BJ. 1999. Dual function of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in placenta: modulating placental glucocorticoid passage and local steroid action. *Biol Reprod*, 60 (2):234-240.
- Bywood PT, Johnson SM. 2000. Dendrite loss is a characteristic early indicator of toxin-induced neurodegeneration in rat midbrain slices. *Exp Neurol*, 161 (1):306-316.
- Cabanas F, Pellicer A, Garcia Alix A, Quero J, Stiris TA. 1997. Effect of dexamethasone therapy on cerebral and ocular blood flow velocity in premature infants studied by colour Doppler flow imaging. *Eur J Pediatr*, 156 (1):41-46.
- Canterino JC, Verma U, Visintainer PF, Elimian A, Klein SA, Tejani N. 2001. Antenatal steroids and neonatal periventricular leukomalacia. *Obstet Gynecol*, 97 (1):135-139.
- Carlos RQ, Seidler FJ, Slotkin TA. 1991. Fetal dexamethasone exposure sensitizes neonatal rat brain to hypoxia: effects on protein and DNA synthesis. *Brain Res Dev Brain Res*, 64 (1-2):161-166.
- Castillo-Melendez M, Chow JA, Walker DW. 2004. Lipid peroxidation, caspase-3 immunoreactivity, and pyknosis in late-gestation fetal sheep brain after umbilical cord occlusion. *Pediatr Res*, 55 (5):864-871.
- Challis JR, Sloboda D, Matthews SG, Holloway A, Alfaidy N, Patel FA, Whittle W, Fraser M, Moss TJ, Newnham J. 2001. The fetal placental hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, parturition and post natal health. *Mol Cell Endocrinol*, 185 (1-2):135-144.
- Chao CR, Hohimer AR, Bissonnette JM. 1989. The effect of electrocortical state on cerebral carbohydrate metabolism in fetal sheep. *Brain Res Dev Brain Res*, 49 (1):1-5.
- Chapotot F, Gronfier C, Jouny C, Muzet A, Brandenberger G (1998) Cortisol secretion is related to electroencephalographic alertness in human subjects during daytime wakefulness. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 4263-8.
- Chemtob S, Beharry K, Rex J, Varma DR, Aranda JV. 1990. Prostanoids determine the range of cerebral blood flow autoregulation of newborn piglets. *Stroke*, 21 (5):777-784.
- Chemtob S, Li DY, Abran D, Peri KG, Varma DR. 1996. Regulation of cerebrovascular prostaglandin E2 (PGE2) and PGF2 alpha receptors and their functions during development. *Semin Perinatol*, 20 (3):164-172.
- Cho K, Little HJ. 1999. Effects of corticosterone on excitatory amino acid responses in dopamine-sensitive neurons in the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 88 (3):837-845.
- Cohlen BJ, Stigter RH, Derks JB, Mulder EJ, Visser GH. 1996. Absence of significant hemodynamic changes in the fetus following maternal betamethasone administration. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 8 (4):252-255.
- Collins JH, Collins CL, Weckwerth SR, De Angelis L. 1995. Nuchal cords: timing of prenatal diagnosis and duration. *Am J Obstet Gynecol*, 173 (3 Pt 1):768.

- Committee on Obstetric P. 2002. ACOG committee opinion: antenatal corticosteroid therapy for fetal maturation. *Obstet Gynecol*, 99 (5 Pt 1):871-873.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. 1990. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem*, 38 (9):1277-1287.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR. 1989. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (2):695-698.
- Crofford LJ. 1997. COX-1 and COX-2 tissue expression: Implications and predictions. *Journal of Rheumatology*, 24 Suppl. 49:15-19.
- Croop JM, Raymond M, Haber D, Devault A, Arceci RJ, Gros P, Housman DE. 1989. The three mouse multidrug resistance (mdr) genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissues. *Mol Cell Biol*, 9 (3):1346-1350.
- Crowley P. 2000. Prophylactic corticosteroids for preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev*, (2):CD000065.
- Czikk MJ, Sweeley JC, Homan JH, Milley JR, Richardson BS. 2003. Cerebral leucine uptake and protein synthesis in the near-term ovine fetus: relation to fetal behavioral state. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284 (1):R200-207.
- Dancis J, Jansen V, Levitz M. 1980. Placental transfer of steroids: effect of binding to serum albumin and to placenta. *Am J Physiol*, 238 (3):E208-213.
- Dawes GS, Serra V, Moulden M, Redman CW. 1994. Dexamethasone and fetal heart rate variation. *Br J Obstet Gynaecol*, 101 (8):675-679.
- Dawes GS, Lobb MO, Mandruzzato G, Moulden M, Redman CW, Wheeler T. 1993. Large fetal heart rate decelerations at term associated with changes in fetal heart rate variation. *Am J Obstet Gynecol*, 168 (1 Pt 1):105-111.
- De Kloet ER, Oitzl MS, Joels M. 1999. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci*, 22 (10):422-426.
- Demarini S, Dollberg S, Hoath SB, Ho M, Donovan EF. 1999. Effects of antenatal corticosteroids on blood pressure in very low birth weight infants during the first 24 hours of life. *J Perinatol*, 19 (6):419-425.
- Derks JB, Mulder EJ, Visser GH. 1995. The effects of maternal betamethasone administration on the fetus. *Br J Obstet Gynaecol*, 102 (1):40-46.
- Derks JB, Giussani DA, Jenkins SL, Wentworth RA, Visser GH, Padbury JF, Nathanielsz PW. 1997. A comparative study of cardiovascular, endocrine and behavioural effects of betamethasone and dexamethasone administration to fetal sheep. *J Physiol Lond*, 499 (Pt 1):217-226.
- Dobbing J, Sands J. 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*, 3 (1):79-83.
- Docherty CC, Kalmar-Nagy J, Engelen M, Koenen SV, Nijland M, Kuc RE, Davenport AP, Nathanielsz PW. 2001. Effect of in vivo fetal infusion of dexamethasone at 0.75 GA on fetal ovine resistance artery responses to ET-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281 (1):R261-268.

- Dodic M, Wintour EM. 1994. Effects of prolonged (48 h) infusion of cortisol on blood pressure, renal function and fetal fluids in the immature ovine foetus. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 21 (12):971-980.
- Domoki F, Veltkamp R, Thrikawala N, Robins G, Bari F, Louis TM, Busija DW. 1999. Ischemia-reperfusion rapidly increases COX-2 expression in piglet cerebral arteries. *Am J Physiol*, 277 (3 Pt 2):H1207-1214.
- Doyle LW, Ford GW, Davis NM, Callanan C. 2000. Antenatal corticosteroid therapy and blood pressure at 14 years of age in preterm children. *Clin Sci (Lond)*, 98 (2):137-142.
- Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. 1994a. Alterations of local cerebral glucose utilization in lean and obese fa/fa rats after acute adrenalectomy. *Brain Res*, 655 (1-2):115-120.
- Doyle P, Guillaume-Gentil C, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. 1994b. Effects of corticosterone administration on local cerebral glucose utilization of rats. *Brain Res*, 645 (1-2):225-230.
- Dumont I, Peri KG, Hardy P, Hou X, Martinez-Bermudez AK, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S. 1998. PGE<sub>2</sub>, via EP<sub>3</sub> receptors, regulates brain nitric oxide synthase in the perinatal period. *Am J Physiol*, 275 (6 Pt 2):R1812-1821.
- Dumont I, Hou X, Hardy P, Peri KG, Beauchamp M, Najarian T, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S. 1999. Developmental regulation of endothelial nitric oxide synthase in cerebral vessels of newborn pig by prostaglandin E<sub>2</sub>. *J Pharmacol Exp Ther*, 291 (2):627-633.
- Duncan JR, Camm E, Loeliger M, Cock ML, Harding R, Rees SM. 2004. Effects of umbilical cord occlusion in late gestation on the ovine fetal brain and retina. *J Soc Gynecol Investig*, 11 (6):369-376.
- Dunlop SA, Archer MA, Quinlivan JA, Beazley LD, Newnham JP. 1997. Repeated prenatal corticosteroids delay myelination in the ovine central nervous system. *J Matern Fetal Med*, 6 (6):309-313.
- Edwards A, Baker LS, Wallace EM. 2002. Changes in fetoplacental vessel flow velocity waveforms following maternal administration of betamethasone. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 20 (3):240-244.
- Elimian A, Verma U, Canterino J, Shah J, Visintainer P, Tejani N. 1999. Effectiveness of antenatal steroids in obstetric subgroups. *Obstet Gynecol*, 93 (2):174-179.
- Emig U. 1996. Einfluß einer Myoglobinämie auf die Durchblutung verschiedener Organe unter hämorrhagischer Hypotension: eine Untersuchung an der narkotisierten Ratte mit Hilfe fluochrommarkierter Mikrosphären [Dissertation]. Göttingen: Georg-August-Universität.
- Endo Y, Nishimura J, Kimura F. 1994. Adrenalectomy increases local cerebral blood flow in the rat hippocampus. *Pflugers Arch*, 426 (3-4):183-188.
- Endo Y, Nishimura JI, Kobayashi S, Kimura F. 1997. Long-term glucocorticoid treatments decrease local cerebral blood flow in the rat hippocampus, in association with histological damage. *Neuroscience*, 79 (3):745-752.
- Erecinska M, Silver IA. 1989. ATP and brain function. *J Cereb Blood Flow Metab* 9: 2-19.
- Esplin MS, Fausett MB, Smith S, Oshiro BT, Porter TF, Branch DW, Varner MW. 2000. Multiple courses of antenatal steroids are associated with a delay in long-term psychomotor development in children with birth weights  $\leq$  1,500 grams. *Am J Obstet Gynecol*, 182:S24.

- Field DR, Parer JT, Auslender RA, Cheek DB, Baker W, Johnson J. 1990. Cerebral oxygen consumption during asphyxia in fetal sheep. *J Dev Physiol*, 14 (3):131-137.
- Figueroa JP, Zhang J, Green J, Rose JC, Massmann GA. 1999. Regional differences on the effects of chronic cortisol administration on PGHS-2 in fetal sheep brain. *J Gynecol Inv*, 6 (Supl.):181A.
- Figueroa JP, Rose JC, Massmann GA, Zhang J, Acuna G. 2005. Alterations in fetal kidney development and elevations in arterial blood pressure in young adult sheep after clinical doses of antenatal glucocorticoids. *Pediatr Res*, 58 (3):510-515.
- Fletcher AJ, Goodfellow MR, Forhead AJ, Gardner DS, McGarrigle HH, Fowden AL, Giussani DA. 2000. Low doses of dexamethasone suppress pituitary-adrenal function but augment the glycemic response to acute hypoxemia in fetal sheep during late gestation. *Pediatr Res*, 47 (5):684-691.
- Fowden AL. 1995. Endocrine regulation of fetal growth. *Reprod Fertil Dev*, 7 (3):351-363.
- French NP, Hagan R, Evans SF, Godfrey M, Newnham JP. 1999. Repeated antenatal corticosteroids: size at birth and subsequent development. *Am J Obstet Gynecol*, 180 (1 Pt 1):114-121.
- Friese K, Dudenhausen JW, Kirschner W, Schafer A, Elkeles T. 2003. [Risk factors of premature birth and their significance for prevention and health promotion--an analysis based on the BabyCare Program]. *Gesundheitswesen*, 65 (8-9):477-485.
- Fujii EY, Takahashi N, Kodama Y, Roman C, Ferriero DM, Parer JT. 2003. Hemodynamic changes during complete umbilical cord occlusion in fetal sheep related to hippocampal neuronal damage. *Am J Obstet Gynecol*, 188 (2):413-418.
- Gabbe SG, Ettinger BB, Freeman RK, Martin CB. 1976. Umbilical cord compression associated with amniotomy: laboratory observations. *Am J Obstet Gynecol*, 126 (3):353-355.
- George S, Gunn AJ, Westgate JA, Brabyn C, Guan J, Bennet L. 2004. Fetal heart rate variability and brain stem injury after asphyxia in preterm fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287 (4):R925-933.
- Giussani DA, Riquelme RA, Hanson MA, Llanos AJ. 1994. Is the rapid and intense peripheral vasoconstriction occurring during acute hypoxaemia in the llama fetus an arterial chemoreflex? *Adv Exp Med Biol*, 360:341-344.
- Giussani DA, Unno N, Jenkins SL, Wentworth RA, Derks JB, Collins JH, Nathanielsz PW. 1997. Dynamics of cardiovascular responses to repeated partial umbilical cord compression in late-gestation sheep fetus. *Am J Physiol*, 273 (5 Pt 2):H2351-2360.
- Glenny RW, Bernard S, Brinkley M (1993). Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J Appl Physiol* 74(5): 2585-97.
- Green LR, Kawagoe Y, Homan J, White SE, Richardson BS. 2001. Adaptation of cardiovascular responses to repetitive umbilical cord occlusion in the late gestation ovine fetus. *J Physiol*, 535 (Pt 3):879-888.
- Greenough A, Lagercrantz H, Pool J, Dahlin I. 1987. Plasma catecholamine levels in preterm infants. Effect of birth asphyxia and Apgar score. *Acta Paediatr Scand*, 76 (1):54-59.
- Grier DG, Halliday HL. 2004. Effects of glucocorticoids on fetal and neonatal lung development. *Treat Respir Med*, 3 (5):295-306.
- Guinn DA, Atkinson MW, Sullivan L, Lee M, MacGregor S, Parilla BV, Davies J, Hanlon-Lundberg K, Simpson L, Stone J, Wing D, Ogasawara K, Muraskas J. 2001. Single vs

- weekly courses of antenatal corticosteroids for women at risk of preterm delivery: A randomized controlled trial. *Jama*, 286 (13):1581-1587.
- Hagberg H, Mallard C. 2000. Antenatal brain injury: aetiology and possibilities of prevention. *Semin Neonatol*. 2000 Feb;5(1):41-51.
- Hakkinen JP, Miller MW, Smith AH, Knight DR. 1995. Measurement of organ blood flow with coloured microspheres in the rat. *Cardiovasc Res*, 29 (1):74-79.
- Hale SL, Vivaldi MT, Kloner RA. 1986. Fluorescent microspheres: a new tool for visualization of ischemic myocardium in rats. *Am J Physiol*, 251 (4 Pt 2):H863-868.
- Hamilton BE, Martin JA, Sutton PD. 2004. Births: preliminary data for 2003. *Natl Vital Stat Rep*, 53 (9):1-17.
- Hassan AH, von Rosenstiel P, Patchev VK, Holsboer F, Almeida OF. 1996. Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Exp Neurol*, 140 (1):43-52.
- Hayashi S, Park MK, Kuehl TJ. 1985. Relaxant and contractile responses to prostaglandins in premature, newborn and adult baboon cerebral arteries. *J Pharmacol Exp Ther*, 233 (3):628-635.
- Hennessy DP, Coghlan JP, Hardy KJ, Scoggins BA, Wintour EM. 1982. The origin of cortisol in the blood of fetal sheep. *J Endocrinol*, 95 (1):71-79.
- Hitzl M, Schaeffeler E, Hoche B, Slowinski T, Halle H, Eichelbaum M, Kaufmann P, Fritz P, Fromm MF, Schwab M. 2004. Variable expression of P-glycoprotein in the human placenta and its association with mutations of the multidrug resistance 1 gene (MDR1, ABCB1). *Pharmacogenetics*, 14 (5):309-318.
- Hooper SB. 1995. Fetal metabolic responses to hypoxia. *Reprod Fertil Dev*, 7:527-538.
- Hossmann KA. 1993. Ischemia-mediated neuronal injury. *Resuscitation*, 26 (3):225-235.
- Hunter CJ, Blood AB, Power GG. 2003. Cerebral metabolism during cord occlusion and hypoxia in the fetal sheep: a novel method of continuous measurement based on heat production. *J Physiol*, 552 (Pt 1):241-251.
- Iadecola C. 1993. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci*, 16 (6):206-214.
- Itskovitz J, LaGamma EF, Rudolph AM. 1983. Baroreflex control of the circulation in chronically instrumented fetal lambs. *Circ Res*, 52 (5):589-596.
- Jackson JR, Kleeman S, Doerzbacher M, Lambers DS. 2003. The effect of glucocorticosteroid administration on fetal movements and biophysical profile scores in normal pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 13 (1):50-53.
- Jasper MS, McDermott P, Gann DS, Engeland WC. 1990. Measurement of blood flow to the adrenal capsule, cortex and medulla in dogs after hemorrhage by fluorescent microspheres. *J Auton Nerv Syst*, 30 (2):159-167.
- Jensen A, Garnier Y, Berger R. 1999. Dynamics of fetal circulatory responses to hypoxia and asphyxia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 84 (2):155-172.
- Jensen A, Klönne HJ, Detmer A, Carter AM. 1996. Catecholamine and serotonin concentrations in fetal guinea-pig brain: relation to regional cerebral blood flow and oxygen delivery in the growth-restricted fetus. *Reprod Fertil Dev*, 8 (3):355-364.

- Jensen A, Bamford OS, Dawes GS, Hofmeyr G, Parkes MJ. 1986. Changes in organ blood flow between high and low voltage electrocortical activity in fetal sheep. *J Dev Physiol*, 8 (3):187-194.
- Jensen A, Berger R. 1991. Fetal circulatory responses to oxygen lack. *J Dev Physiol*, 16 (4):181-207.
- Jensen A, Hohmann M, Kunzel W. 1987. Redistribution of fetal circulation during repeated asphyxia in sheep: effects on skin blood flow, transcutaneous PO<sub>2</sub>, and plasma catecholamines. *J Dev Physiol* 9(1):41-55.
- Jobe AH. 2003. Animal models of antenatal corticosteroids: clinical implications. *Clin Obstet Gynecol*, 46 (1):174-189.
- Johannsson H, Siesjö B. 1975. Cerebral blood flow and oxygen consumption in the rat in hypoxic hypoxia. *Acta Physiol Scand*, 93: 269±276.
- Johns RA. 2001. New mechanisms for inhaled NO: release of an endogenous NO inhibitor? *Anesthesiology*, 95 (1):3-5.
- Jones MD, Jr., Sheldon RE, Peeters LL, Makowski EL, Meschia G. 1978. Regulation of cerebral blood flow in the ovine fetus. *Am J Physiol*, 235 (2):H162-166.
- Joseph K, Allen A, Dodds L. 2001. Causes and consequences of recent increases in preterm birth among twins. *ObstetGynecol*, 98:57–64.
- Jorch G. 1993. [Periventricular leukomalacia]. *Monatsschr Kinderheilkd* 141(7): 567-72.
- Kadekaro M, Ito M, Gross PM. 1988. Local cerebral glucose utilization is increased in acutely adrenalectomized rats. *Neuroendocrinology*, 47 (4):329-334.
- Kaneko M, White S, Homan J, Richardson B. 2003. Cerebral blood flow and metabolism in relation to electrocortical activity with severe umbilical cord occlusion in the near-term ovine fetus. *Am J Obstet Gynecol*, 188 (4):961-972.
- Kanse SM, Takahashi K, Warren JB, Perera T, Porta M, Ghatei M, Bloom SR. 1991. Production of endothelin by vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 17 Suppl 7:S113-116.
- Karimova A, Pinsky DJ. 2001. The endothelial response to oxygen deprivation: biology and clinical implications. *Intensive Care Med* 27(1): 19-31.
- Kauffman KS, Seidler FJ, Slotkin TA. 1994. Prenatal dexamethasone exposure causes loss of neonatal hypoxia tolerance: cellular mechanisms. *Pediatr Res*, 35 (5):515-522.
- Kent A, Lomas F, Hurron E, Dahlstrom JE. 2005. Antenatal steroids may reduce adverse neurological outcome following chorioamnionitis: neurodevelopmental outcome and chorioamnionitis in premature infants. *J Paediatr Child Health*, 41 (4):186-190.
- Koenen SV, Mecnas CA, Smith GS, Jenkins S, Nathanielsz PW. 2002. Effects of maternal betamethasone administration on fetal and maternal blood pressure and heart rate in the baboon at 0.7 of gestation. *Am J Obstet Gynecol*, 186 (4):812-817.
- Kofman O. 2002. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, 26 (4):457-470.
- Koide T, Wieloch TW, Siesjo BK. 1986. Chronic dexamethasone pretreatment aggravates ischemic neuronal necrosis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 6 (4):395-404.

- Kojda G, Harrison D. 1999. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*, 43 (3):562-571.
- Kornel L, Nelson WA, Manisundaram B, Chigurupati R, Hayashi T. 1993. Mechanism of the effects of glucocorticoids and mineralocorticoids on vascular smooth muscle contractility. *Steroids*, 58 (12):580-587.
- Kowallik P, Schulz R, Guth BD, Schade A, Paffhausen W, Gross R, Heusch G. 1991. Measurement of regional myocardial blood flow with multiple colored microspheres. *Circulation*, 83 (3):974-982.
- Kream J, Mulay S, Fukushima DK, Solomon S. 1983. Determination of plasma dexamethasone in the mother and the newborn after administration of the hormone in a clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab*, 56 (1):127-133.
- Krozowski Z. 1999. The 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases: functions and physiological effects. *Mol Cell Endocrinol*, 151 (1-2):121-127.
- Kutzler MA, Ruane EK, Coksaygan T, Vincent SE, Nathanielsz PW. 2004. Effects of three courses of maternally administered dexamethasone at 0.7, 0.75, and 0.8 of gestation on prenatal and postnatal growth in sheep. *Pediatrics*, 113 (2):313-319.
- Leffler CW. 1997. Prostanoids: Intrinsic modulators of cerebral circulation. *News Physiol Sci*, 12:72-77.
- Leffler CW, Parfenova H. 1997. Cerebral arteriolar dilation to hypoxia: role of prostanoids. *Am J Physiol*, 272 (1 Pt 2):H418-424.
- Levitz M, Jansen V, Dancis J. 1978. The transfer and metabolism of corticosteroids in the perfused human placenta. *Am J Obstet Gynecol*, 132 (4):363-366.
- Li DY, Varma DR, Chemtob S. 1994. Ontogenic increase in PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub>  $\alpha$  receptor density in brain microvessels of pigs. *Br J Pharmacol*, 112 (1):59-64.
- Li DY, Varma DR, Chemtob S. 1995. Up-regulation of brain PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub>  $\alpha$  receptors and receptor-coupled second messengers by cyclooxygenase inhibition in newborn pigs. *J Pharmacol Exp Ther*, 272 (1):15-19.
- Li DY, Hardy P, Abran D, Martinez Bermudez AK, Guerguerian AM, Bhattacharya M, Almazan G, Menezes R, Peri KG, Varma DR, Chemtob S. 1997. Key role for cyclooxygenase-2 in PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> $\alpha$  receptor regulation and cerebral blood flow of the newborn. *Am J Physiol*, 273 (4 Pt 2):R1283-1290.
- Liggins GC. 1967. Failure of initiation of parturition after electrocoagulation of the pituitary of the fetal lamb. *Am J Obstet Gynecol*, (98):1080-1086.
- Liggins GC. 1969. Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J Endocrinol*, 45 (4):515-523.
- Liggins GC, Howie RN. 1972. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics*, 50 (4):515-525.
- Liu Y, Wada H, Takada S, Uetani Y, Itoh H, Nakamura H. 1995. Preventive effects of dexamethasone on hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. *Brain Dev*, 17 (3):186-192.
- Löhle M, Müller T, Wicher C, Roedel M, Schubert H, Witte OW, Nathanielsz PW, Schwab M. 2005. Betamethasone effects on fetal sheep cerebral blood flow are not dependent on



- maturation of cerebrovascular system and pituitary-adrenal axis. *J Physiol*, 564 (Pt 2):575-588.
- Lupien SJ, McEwen BS. 1997. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Brain Res Rev*, 24 (1):1-27.
- Lydic R, Baghdoyan HA, Hibbard L, Bonyak EV, DeJoseph MR, Hawkins RA. 1991. Regional brain glucose metabolism is altered during rapid eye movement sleep in the cat: a preliminary study. *J Comp Neurol*, 304 (4):517-529.
- Madsen PL, Schmidt JF, Wildschiodtz G, Friberg L, Holm S, Vorstrup S, Lassen NA. 1991. Cerebral O<sub>2</sub> metabolism and cerebral blood flow in humans during deep and rapid-eye-movement sleep. *J Appl Physiol*, 70 (6):2597-2601.
- Mallard CE, Gunn AJ, Williams CE, Johnston BM, Gluckman PD. 1992. Transient umbilical cord occlusion causes hippocampal damage in the fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol*, 167:1423-1430.
- Mallard EC, Williams CE, Johnston BM, Gunning MI, Davis S, Gluckman PD. 1995. Repeated episodes of umbilical cord occlusion in fetal sheep lead to preferential damage to the striatum and sensitize the heart to further insults. *Pediatr Res*, 37 (6):707-713.
- Marks KA, Mallard CE, Roberts I, Williams CE, Gluckman PD, Edwards AD. 1996a. Nitric oxide synthase inhibition attenuates delayed vasodilation and increases injury after cerebral ischemia in fetal sheep. *Pediatr Res*, 40 (2):185-191.
- Marks KA, Mallard EC, Roberts I, Williams CE, Sirimanne ES, Johnston B, Gluckman PD, Edwards AD. 1996b. Delayed vasodilation and altered oxygenation after cerebral ischemia in fetal sheep. *Pediatr Res*, 39 (1):48-54.
- Marumo G, Kozuma S, Ohyu J, Hamai Y, Machida Y, Kobayashi K, Ryo E, Unno N, Fujii T, Baba K, Okai T, Takashima S, Taketani Y. 2001. Generation of periventricular leukomalacia by repeated umbilical cord occlusion in near-term fetal sheep and its possible pathogenetical mechanisms. *Biol Neonate*, 79 (1):39-45.
- McCord JM. 1985. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*, 312 (3):159-163.
- McEwen BS. 1994. Steroid hormone actions on the brain: when is the genome involved? *Horm Behav*, 28 (4):396-405.
- McEwen BS, Albeck D, Cameron H, Chao HM, Gould E, Hastings N, Kuroda Y, Luine V, Magarinos AM, McKittrick CR, et al. 1995. Stress and the brain: a paradoxical role for adrenal steroids. *Vitam Horm*, 51:371-402.
- McNerney ME, Szeto HH. 1990. Automated identification and quantitation of four patterns of electrocortical activity in the near-term fetal lamb. *Pediatr Res*, 28 (2):106-110.
- McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, Kourembanas S. 1994. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol*, 267 (5 Pt 2):H1921-1927.
- Meadow WL, Bell A, Sunstein CR. 2003. Statistics, not memories: what was the standard of care for administering antenatal steroids to women in preterm labor between 1985 and 2000? *Obstet Gynecol*, 102 (2):356-362.
- Meijer OC, de Lange EC, Breimer DD, de Boer AG, Workel JO, de Kloet ER. 1998. Penetration of dexamethasone into skund glucocorticoid targets is enhanced in mdr1A P-glycoprotein knockout mice. *Endocrinology*, 139 (4):1789-1793.

- Ment LR, Stewart WB, Duncan CC, Pitt BR, Cole J. 1987. Beagle pup model of brain injury: regional cerebral blood flow and cerebral prostaglandins. *J Neurosurg*, 67 (2):278-283.
- Ment LR, Oh W, Ehrenkranz RA, Philip AG, Duncan CC, Makuch RW. 1995. Antenatal steroids, delivery mode, and intraventricular hemorrhage in preterm infants. *Am J Obstet Gynecol*, 172 (3):795-800.
- Miettinen S, Fusco FR, Yrjanheikki J, Keinänen R, Hirovonen T, Roivainen R, Narhi M, Hokfelt T, Koistinaho J. 1997. Spreading depression and focal brain ischemia induce cyclooxygenase-2 in cortical neurons through N-methyl-D-aspartic acid-receptors and phospholipase A(2). *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 94 (12):6500-6505.
- Moon PF, Ramsey MM, Duboff A, Nathanielsz PW. 2000. Fetal cerebral blood flow is symmetrically distributed in regional areas of the brain after occlusion of one fetal carotid artery. *J Soc Gynecol Invest* 7 (Suppl.): 114A.
- Mulder EJ, Derks JB, Visser GH. 2004. Effects of antenatal betamethasone administration on fetal heart rate and behavior in twin pregnancy. *Pediatr Res*, 56 (1):35-39.
- Müller T, Löhle M, Schubert H, Bauer R, Wicher C, Antonow-Schlorke I, Sliwka U, Nathanielsz PW, Schwab M. 2002. Developmental changes in cerebral autoregulatory capacity in the fetal sheep parietal cortex. *J Physiol*, 539 (Pt 3):957-967.
- Müller T, Frasch M, Weiss C, Reinhardt B, Antonow-Schlorke I, Schubert H, Witte O, Schwab M. 2006. Betamethasone reduces the redistribution of cerebral blood flow during asphyxia in fetal sheep at 125 days gestational age. 53rd Annual Society of Gynecological Investigation Meeting, Toronto, Canada.
- Nakanishi H, Sun Y, Nakamura RK, Mori K, Ito M, Suda S, Namba H, Storch FI, Dang TP, Mendelson W, Mishkin M, Kennedy C, Gillin JC, Smith CB, Sokoloff L. 1997. Positive correlations between cerebral protein synthesis rates and deep sleep in Macaca mulatta. *Eur J Neurosci*, 9 (2):271-279.
- Newnham JP, Moss TJ. 2001. Antenatal glucocorticoids and growth: single versus multiple doses in animal and human studies. *Semin Neonatol*, 6 (4):285-292.
- NIH. 1995. Consensus Development Panel: Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. *Am J Obstet Gynecol*, 173:246-252.
- Nijhuis JG, Prechtl HF, Martin CB, Jr., Bots RS. 1982. Are there behavioural states in the human fetus? *Early Hum Dev*, 6 (2):177-195.
- Northington FJ, Koehler RC, Traystman RJ, Martin LJ. 1996. Nitric oxide synthase 1 and nitric oxide synthase 3 protein expression is regionally and temporally regulated in fetal brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 95 (1):1-14.
- Ohyu J, Marumo G, Ozawa H, Takashima S, Nakajima K, Kohsaka S, Hamai Y, Machida Y, Kobayashi K, Ryo E, Baba K, Kozuma S, Okai T, Taketani Y. 1999. Early axonal and glial pathology in fetal sheep brains with leukomalacia induced by repeated umbilical cord occlusion. *Brain Dev*, 21 (4):248-252.
- Osak R, Webster KM, Bocking AD, Campbell MK, Richardson BS. 1997. Nuchal cord evident at birth impacts on fetal size relative to that of the placenta. *Early Hum Dev*, 49 (3):193-202.
- Ottaviano C, De Marchis C, Orzalesi M. 2001. [Hypoxic-ischemic encephalopathy in newborns]. *Ann Ist Super Sanita*, 37 (4):473-482.

- Owen D, Andrews MH, Matthews SG. 2005. Maternal adversity, glucocorticoids and programming of neuroendocrine function and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev*, 29 (2):209-226.
- Padbury JF, Polk DH, Ervin MG, Berry LM, Ikegami M, Jobe AH. 1995. Postnatal cardiovascular and metabolic responses to a single intramuscular dose of betamethasone in fetal sheep born prematurely by cesarean section. *Pediatr Res*, 38 (5):709-715.
- Peirano P, Algarin C, Uauy R. 2003. Sleep-wake states and their regulatory mechanisms throughout early human development. *J Pediatr*, 143 (4 Suppl):S70-79.
- Peri KG, Hardy P, Li DY, Varma DR, Chemtob S. 1995. Prostaglandin G/H synthase-2 is a major contributor of brain prostaglandins in the newborn. *J Biol Chem*, 270 (41):24615-24620.
- Perreault T, Coceani F. 2003. Endothelin in the perinatal circulation. *Can J Physiol Pharmacol*, 81 (6):644-653.
- Petersen MC, Nation RL, Ashley JJ, McBride WG. 1980. The placental transfer of betamethasone. *Eur J Clin Pharmacol*, 18 (3):245-247.
- Prado R, Watson BD, Kuluz J, Dietrich WD. 1992. Endothelium-derived nitric oxide synthase inhibition. Effects on cerebral blood flow, pial artery diameter, and vascular morphology in rats. *Stroke*, 23 (8):1118-1123.
- Provencher PH, Saltis J, Funder JW. 1995. Glucocorticoids but not mineralocorticoids modulate endothelin-1 and angiotensin II binding in SHR vascular smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 52 (3):219-225.
- Pryds O, Greisen G, Lou H, Friis-Hansen B. 1990. Vasoparalysis associated with brain damage in asphyxiated term infants. *J Pediatr*, 117 (1 Pt 1):119-125.
- Pulsinelli WA, Waldman S, Rawlinson D, Plum F. 1982. Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage: a neuropathologic study in the rat. *Neurology*, 32 (11):1239-1246.
- Purves MJ, James IM. 1969. Observations on the control of cerebral blood flow in the sheep fetus and newborn lamb. *Circ Res*, 25 (6):651-667.
- Raad RA, Tan WK, Bennet L, Gunn AJ, Davis SL, Gluckman PD, Johnston BM, Williams CE. 1999. Role of the cerebrovascular and metabolic responses in the delayed phases of injury after transient cerebral ischemia in fetal sheep. *Stroke*, 30 (12):2735-2741; discussion 2741-2732.
- Ramm P, Smith CT. 1990. Rates of cerebral protein synthesis are linked to slow wave sleep in the rat. *Physiol Behav*, 48 (5):749-753.
- Richardson BS, Patrick JE, Abduljabbar H. 1985. Cerebral oxidative metabolism in the fetal lamb: relationship to electrocortical state. *Am J Obstet Gynecol*, 153 (4):426-431.
- Richardson BS. 1992. The effect of behavioral state on fetal metabolism and blood flow circulation. *Semin Perinatol*, 16 (4):227-233.
- Richardson BS, Caetano H, Homan J, Carmichael L. 1994. Regional brain blood flow in the ovine fetus during transition to the low-voltage electrocortical state. *Brain Res Dev Brain Res*, 81 (1):10-16.
- Risau W, Wolburg H. 1990. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci*, 13 (5):174-178.

- Roelfsema V, Gunn AJ, Fraser M, Quaedackers JS, Bennet L. 2005. Cortisol and ACTH responses to severe asphyxia in preterm fetal sheep. *Exp Physiol*,
- Rosenberg AA, Murdaugh E. 1990. The effect of blood glucose concentration on postasphyxia cerebral hemodynamics in newborn lambs. *Pediatr Res*, 27 (5):454-459.
- Rosenberg AA, Murdaugh E, White CW. 1989. The role of oxygen free radicals in postasphyxia cerebral hypoperfusion in newborn lambs. *Pediatr Res*, 26 (3):215-219.
- Rotmensch S, Lev S, Kovo M, Efrat Z, Zahavi Z, Lev N, Celentano C, Ben-Rafael Z. 2005. Effect of betamethasone administration on fetal heart rate tracing: a blinded longitudinal study. *Fetal Diagn Ther*, 20 (5):371-376.
- Rotmensch S, Liberati M, Celentano C, Efrat Z, Bar-Hava I, Kovo M, Golan A, Moravski G, Ben-Rafael Z. 1999. The effect of betamethasone on fetal biophysical activities and Doppler velocimetry of umbilical and middle cerebral arteries. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 78 (9):768-773.
- Rubanyi GM, Botelho LH. 1991. Endothelins. *FASEB J* 5(12): 2713-20.
- Rudolph AM, Heymann MA. 1967. The circulation of the fetus in utero. Methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. *Circ Res*, 21 (2):163-184.
- Rüsse I, Sinowatz F. 1991. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Aufl. Berlin [u.a.]: Parey.
- Sapolsky RM. 1985. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: temporal aspects of neuronal vulnerability. *Brain Res*, 359 (1-2):300-305.
- Sapolsky RM. 1994. The physiological relevance of glucocorticoid endangerment of the hippocampus. *Ann N Y Acad Sci*, 746:294-304; discussion 304-297.
- Sapolsky RM, Pulsinelli WA. 1985. Glucocorticoids potentiate ischemic injury to neurons: therapeutic implications. *Science*, 229 (4720):1397-1400.
- Saruta T. 1996. Mechanism of glucocorticoid-induced hypertension. *Hypertens Res*, 19 (1):1-8.
- Schleussner E, Schneider U, Arnscheidt C, Kahler C, Haueisen J, Seewald HJ. 2004. Prenatal evidence of left-right asymmetries in auditory evoked responses using fetal magnetoencephalography. *Early Hum Dev*, 78 (2):133-136.
- Schneider H. 2001. [Birth asphyxia - an unsolved problem of perinatal medicine]. *Z Geburtshilfe Neonatol*, 205 (6):205-212.
- Schmidt K, Schwab M, Coksaygan T, Nijland MJ, Nathanielsz PW. 2002. Effects of maternal betamethasone administration on the electrocorticogram (ECoG) of fetal sheep at 0.75 of gestation. *J Soc Gynecol Invest* 9 (Suppl.): 698.
- Schwab M, Roedel M, Anwar MA, Muller T, Schubert H, Buchwalder LF, Walter B, Nathanielsz W. 2000. Effects of betamethasone administration to the fetal sheep in late gestation on fetal cerebral blood flow. *J Physiol*, 528 (Pt 3):619-632.
- Schwab M, Antonow-Schlorke I, Kuhn B, Muller T, Schubert H, Walter B, Sliwka U, Nathanielsz PW. 2001a. Effect of antenatal betamethasone treatment on microtubule-associated proteins MAP1B and MAP2 in fetal sheep. *J Physiol*, 530 (Pt 3):497-506.
- Schwab M, Schmidt K, Roedel M, Müller T, Schubert H, Anwar MA, Nathanielsz PW. 2001b. Non-linear changes of electrocortical activity after antenatal betamethasone treatment in fetal sheep. *J Physiol (London)* 531(2): 535-543.

- Schwab M., Antonow-Schlorke I, Müller T., Löhle M., Wood, C.E., Schubert H., Nathanielsz P.W., Witte O.W. 2004. Glucocorticoid (GC) induced maturation of cerebral autoregulation may explain the decreased incidence of intraventricular hemorrhage (IVH) and increased risk of periventricular leukomalacia (PVL). Soc. Neurosci. 821.4.
- Schwab M, Wichmann G, Loehle M, Nathanielsz PW, Maurer I, Witte OW. 2005. Antenatal glucocorticoids suppress cytochrom c oxidase activity in the fetal ovine brain, 32th Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society, Adelaide (Australien), 24.-28.9.2005.
- Schwab M, Coksaygan T, Samtani MN, Jusko WJ, Nathanielsz PW. 2006. Kinetics of betamethasone in pregnant sheep after different doses; is the clinical dose supramaximal? In Druck.
- Seckl JR, Meaney MJ. 2004. Glucocorticoid programming. Ann N Y Acad Sci, 1032:63-84.
- Selton D, Andre M, Hascoet JM. 2000. Normal EEG in very premature infants: reference criteria. Clin Neurophysiol, 111:2116-2124.
- Shaffer J. 1986. Modified sequentially rejective multiple test procedures. Journal of the American Statistical Association. 81:826-831
- Shams M, Kilby MD, Somerset DA, Howie AJ, Gupta A, Wood PJ, Afran M, Stewart PM. 1998. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction. Hum Reprod, 13 (4):799-804.
- Shinozuka N, Nathanielsz PW. 1998. Electrocortical activity in fetal sheep in the last seven days of gestation. J Physiol (Lond) 513(Pt 1): 273-81.
- Shinwell ES, Karplus M, Reich D, Weintraub Z, Blazer S, Bader D, Yurman S, Dolfen T, Kogan A, Dollberg S, Arbel E, Goldberg M, Gur I, Naor N, Sirota L, Mogilner S, Zaritsky A, Barak M, Gottfried E. 2000. Early postnatal dexamethasone treatment and increased incidence of cerebral palsy. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 83 (3):F177-181.
- Siassi B, Wu PY, Blanco C, Martin CB. 1979. Baroreceptor and chemoreceptor responses to umbilical cord occlusion in fetal lambs. Biol Neonate, 35 (1-2):66-73.
- Siebe H, Baude G, Lichtenstein I, Wang D, Buhler H, Hoyer GA, Hierholzer K. 1993. Metabolism of dexamethasone: sites and activity in mammalian tissues. Ren Physiol Biochem, 16 (1-2):79-88.
- Silvani A, Bojic T, Franzini C, Lenzi P, Walker AM, Grant DA, Wild J, Zoccoli G. 2004. Sleep-related changes in the regulation of cerebral blood flow in newborn lambs. Sleep, 27 (1):36-41.
- Singer D. 1999. Neonatal tolerance to hypoxia: a comparative-physiological approach. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 123 (3):221-234.
- Stauber M, Weyerstahl T. 2001. Gynäkologie und Geburtshilfe. Stuttgart:Thieme.
- Supko DE, Johnston MV. 1994. Dexamethasone potentiates NMDA receptor-mediated neuronal injury in the postnatal rat. Eur J Pharmacol, 270 (1):105-113.
- Supramaniam VG, Jenkin G, Wallace EM, O'Connor A E, de Kretser DM, Miller SL. 2004. Effect of graded hypoxia on activin A, prostaglandin E2 and cortisol levels in the late-pregnant sheep. Reprod Fertil Dev, 16 (6):625-632.
- Szeto HH, Hinman. 1985. Prenatal development of sleep-wake patterns in sheep. Sleep, 8:347-355.

- Tan WK, Williams CE, Gunn AJ, Mallard CE, Gluckman PD. 1992. Suppression of postischemic epileptiform activity with MK-801 improves neural outcome in fetal sheep. *Ann Neurol*, 32 (5):677-682.
- Tangalakis K, Lumbers ER, Moritz KM, Towstoles MK, Wintour EM. 1992. Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine fetus. *Exp Physiol*, 77 (5):709-717.
- Tangalakis K, Coghlan JP, Connell J, Crawford R, Darling P, Hammond VE, Haralambidis J, Penschow J, Wintour EM. 1989. Tissue distribution and levels of gene expression of three steroid hydroxylases in ovine fetal adrenal glands. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 120 (2):225-232.
- Takada H, Yoneyama Y, Power GG, Araki T. 1996. Plasma endothelin-1 levels during asphyxia in the fetal goat. *Gynecol Obstet Invest*, 42 (4):217-221.
- Takagi S, Cocito L, Hossmann KA. 1977. Blood recirculation and pharmacological responsiveness of the cerebral vasculature following prolonged ischemia of cat brain. *Stroke*, 8 (6):707-712.
- Tolcos M, Harding R, Loeliger M, Breen S, Cock M, Duncan J, Rees S. 2003. The fetal brainstem is relatively spared from injury following intrauterine hypoxemia. *Brain Res Dev Brain Res*, 143 (1):73-81.
- Tombaugh GC, Sapolsky RM. 1992. Corticosterone accelerates hypoxia- and cyanide-induced ATP loss in cultured hippocampal astrocytes. *Brain Res*, 588 (1):154-158.
- Trenque T, Lamiabie D, Vistelle R, Millart H, Leperre A, Choisy H. 1994. Comparative pharmacokinetics of two diastereoisomers dexamethasone and betamethasone in plasma and cerebrospinal fluid in rabbits. *Fundam Clin Pharmacol*, 8 (5):430-436.
- Tsang MC, Lo AC, Cheung PT, Chung SS, Chung SK. 2001. Perinatal hypoxia-/ischemia-induced endothelin-1 mRNA in astrocyte-like and endothelial cells. *Neuroreport* 12(10): 2265-70.
- Tucker RP. 1990. The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res Brain Res Rev*, 15 (2):101-120.
- Tuor UI. 1997. Glucocorticoids and the prevention of hypoxic-ischemic brain damage. *Neuroscience Biobehav Rev*, 21:175-179.
- Tuor UI, Yager JY, Bascaramurty S, DelBigio MR. 1997. Dexamethasone prevents hypoxia/ischemia-induced reductions in cerebral glucose utilization and high-energy phosphate metabolites in immature brain. *J Neurochem*, 69:1954-1963.
- Unno N, Wong CH, Jenkins SL, Wentworth RA, Ding XY, Li C, Robertson SS, Smotherman WP, Nathanielsz PW. 1999. Blood pressure and heart rate in the ovine fetus: ontogenic changes and effects of fetal adrenalectomy. *Am J Physiol*, 276 (1 Pt 2):0002-9513.
- Uno H, Eisele S, Sakai A, Shelton S, Baker E, DeJesus O, Holden J. 1994. Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Horm Behav*, 28 (4):336-348.
- von Harnack G-A, Koletzko B. 1997. *Kinderheilkunde*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag
- van Bel F, Sola A, Roman C, Rudolph AM. 1995. Role of nitric oxide in the regulation of the cerebral circulation in the lamb fetus during normoxemia and hypoxemia. *Biol Neonate*, 68 (3):200-210.

- Van Oosterhout MF, Prinzen FW, Sakurada S, Glenn RW, Hales JR. 1998. Fluorescent microspheres are superior to radioactive microspheres in chronic blood flow measurements. *Am J Physiol*, 275 (1 Pt 2):H110-115.
- Vannucci RC, Brucklacher RM, Vannucci SJ. 1996. The effect of hyperglycemia on cerebral metabolism during hypoxia-ischemia in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16 (5):1026-1033.
- Vannucci RC. 2000. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol*, 17 (3):113-120.
- Vannucci SJ, Hagberg H. 2004. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol*, 207 (Pt 18):3149-3154.
- Vielkind U, Walencewicz A, Levine JM, Bohn MC. 1990. Type II glucocorticoid receptors are expressed in oligodendrocytes and astrocytes. *J Neurosci Res*, 27 (3):360-373.
- Vohr BR, Wright LL, Poole WK, McDonald SA. 2005. Neurodevelopmental outcomes of extremely low birth weight infants <32 weeks' gestation between 1993 and 1998. *Pediatrics*, 116 (3):635-643.
- Volpe J. 1997. Brain injury in the premature infant — neuropathology, clinical aspects and pathogenesis. *Clinics in Perinatology*, 24:567—587.
- Volpe JJ. 2000. Overview: normal and abnormal human brain development. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 6 (1):1-5.
- Wagerle LC, DeGiulio PA, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. 1991. Effect of dexamethasone on cerebral prostanoid formation and pial arteriolar reactivity to CO<sub>2</sub> in newborn pigs. *Am J Physiol*, 260 (4 Pt 2):H1313-1318.
- Walker BR, Connacher AA, Webb DJ, Edwards CR. 1992. Glucocorticoids and blood pressure: a role for the cortisol/cortisone shuttle in the control of vascular tone in man. *Clin Sci Colch*, 83 (2):171-178.
- Wallerath T, Witte K, Schafer SC, Schwarz PM, Prellwitz W, Wohlfart P, Kleinert H, Lehr HA, Lemmer B, Forstermann U. 1999. Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (23):13357-13362.
- Wapner RJ, Waters T. 2003. Introduction and historical perspective. *Clinical gynecology and obstetrics*, 46:125-131.
- Warner B, Kiely J, Donovan E. 2000. Multiple births and outcome. *Clin Perinatol*, 27:347–361.
- Whitworth JA, Schyvens CG, Zhang Y, Andrews MC, Mangos GJ, Kelly JJ. 2002. The nitric oxide system in glucocorticoid-induced hypertension. *J Hypertens*, 20 (6):1035-1043.
- Wijnberger LD, Mostert JM, van Dam KI, Mol BW, Brouwers H, Visser GH. 2002. Comparison of single and repeated antenatal corticosteroid therapy to prevent neonatal death and morbidity in the preterm infant. *Early Hum Dev*, 67 (1-2):29-36.
- Willet KE, McMenamin P, Pinkerton KE, Ikegami M, Jobe AH, Gurrin L, Sly PD. 1999. Lung morphometry and collagen and elastin content: changes during normal development and after prenatal hormone exposure in sheep. *Pediatr Res*, 45 (5 Pt 1):615-625.
- Wood C.E. SM, Coksaygen T., Nathanielsz P.W. 2003. Downregulation of Prostaglandin Endoperoxide Synthase-2 Gene Expression by Betamethasone in ovine fetal brain stem and cortex. *J Soc Gynecol Investig*, 10 (Suppl.): 764.

- Wood NS, Marlow N, Costeloe K, Gibson AT, Wilkinson AR. 2000. Neurologic and developmental disability after extremely preterm birth. EPICure Study Group. *N Engl J Med*, 343 (6):378-384.
- Yager JY, Thornhill JA. 1997. The effect of age on susceptibility to hypoxic-ischemic brain damage. *Neurosci Biobehav Rev*, 21 (2):167-174.
- Yates CR, Chang C, Kearbey JD, Yasuda K, Schuetz EG, Miller DD, Dalton JT, Swaan PW. 2003. Structural determinants of P-glycoprotein-mediated transport of glucocorticoids. *Pharm Res*, 20 (11):1794-1803.
- Young AM, Allen CE, Audus KL. 2003. Efflux transporters of the human placenta. *Adv Drug Deliv Rev*, 55 (1):125-132.



## **9. Anhang**

### **9.1. Danksagung**

Besonderen Dank schulde ich meinem betreuenden Hochschullehrer, Herrn PD Dr. med. Matthias Schwab, für die Vergabe der Thematik, die ständig gewährte Beratung und Unterstützung, sowie alle Anregungen und kritischen Hinweise bei der Vorbereitung und Fertigstellung der vorliegenden Arbeit.

Stellvertretend für die Mitarbeiter des Instituts für Versuchstierkunde der FSU Jena möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Harald Schubert sowie Herrn Dr. med. vet. Thomas Müller bedanken, ohne deren Hilfe die Durchführung der Versuche nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. med. Martin Frasch für die Hilfe bei computertechnischen Problemen, Frau Claudia Hiepe für die Einführung in die Mikrosphärenaufarbeitung, sowie der gesamten Arbeitsgruppe „Fetale Programmierung“ der FSU Jena.

## 9.2. Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Name	Bettina Reinhardt
Geburtstag	29.05.1982
Geburtsort	Erfurt
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

### Schulbildung

1988-1992	Rötlein-Grundschule, Zeulenroda
1992-2000	Friedrich-Schiller-Gymnasium, Zeulenroda
2000	Abitur

### Studium

2000	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
2000-2002	Vorklinischer Studienabschnitt
2002	Physikum
2002-2003	Erster Abschnitt der klinischen Ausbildung
2003	1.Staatsexamen
2003-2005	Zweiter Abschnitt der klinischen Ausbildung
2004/2005	Erasmusaufenthalt in Strasbourg, Frankreich
2006	2.Staatsexamen

Jena, den 30.Januar 2006

**9.3. Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr PD Dr. med. Matthias Schwab (Klinik für Neurologie), die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 30. Januar 2006